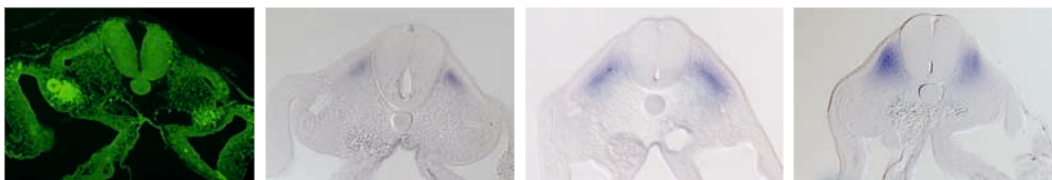


Studien zum Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenentwicklung beim Hühnerembryo

JOHANNA NESEMANN

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinäranatomie, -Histologie und -Embryologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Bergmann

und

Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Freiburg i. Brsg.

Betreuer: Prof. Dr. Martin Scaal

Studien zum Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenentwicklung beim Hühnerembryo

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Johanna Neseemann

Tierärztin aus Köln

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Bergmann

Prof. Dr. Martin Scaal

Tag der Disputation: 16.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Gastrulation.....	1
1.2 Entwicklung des Mesoderm.....	2
1.2.1 Paraxiales Mesoderm.....	3
1.2.1.1 Somiten.....	3
1.2.1.2 Kompartimentierung der Somiten.....	4
1.2.1.3 Gene und Transkriptionsfaktoren.....	8
1.2.2 Sklerotombildung.....	8
1.2.2.1 Gene in der Bildung und Differenzierung des Sklerotom.....	9
1.2.2.2 Sklerotomderivate.....	10
1.2.3 Dermomyotombildung.....	10
1.2.3.1 Gene in der Bildung und Entwicklung des Dermomyotom.....	10
1.2.3.2 Dermomyotomderivate.....	11
1.2.4 Myotombildung.....	12
1.2.4.1 Gene in der Bildung und Entwicklung des Myotom.....	12
1.2.4.2 Myotomderivate.....	13
1.2.5 Intermediäres Mesoderm.....	13
1.2.5.1 Der Wolffsche Gang.....	13
1.2.5.2 Gene und Transkriptionsfaktoren.....	15
1.2.5.3 Derivate des Wolffschen Ganges.....	16
1.3 Nomenklatur.....	16
1.4 Wissenschaftliche Fragestellung.....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Versuchsaufbau.....	19
2.2 Embryonen.....	19
2.3 Mikrochirurgie.....	20
2.3.1 Vor-und Nachbereitung.....	20

2.3.2 Operation.....	21
2.3.3 Präparation.....	21
2.3.4 Fixierung und Einbettung.....	24
2.3.4.1 Fixierung für in situ--Hybridisierung.....	24
2.3.4.2 Fixierung und Einbettung für Immunhistochemie.....	24
2.3.4.3 Fixierung und Einbettung für Semidünnschnitte.....	24
2.3.5 Histologische Techniken/Methoden.....	25
2.3.5.1 in situ--Hybridisierung.....	25
2.3.5.2 Immunhistochemie.....	27
2.3.5.3 Semidünnschnitte.....	28
2.3.6 Fotografie.....	28
2.3.7 Operationsfeld und Struktur des Wolffschen Ganges.....	29
2.3.8 Embryonen zum Zeitpunkt der Untersuchung.....	30
2.3.9 Puffer, Proteine und Chemikalien.....	30
2.3.10 Primäre Antikörper	32
2.3.11 Sekundäre Antikörper.....	32
2.3.12 Enzyme.....	32
2.3.13 Sonden/Plasmide.....	32
2.3.14 Andere Chemikalien.....	32
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Ergebnisse Semidünnschnitte.....	34
3.2 Ergebnisse Immunhistochemie.....	36
3.3 Ergebnisse in situ-Hybridisierung.....	39
3.3.1 Wholemoundarstellung Pax2.....	39
3.3.2 Schnittdarstellung Pax2.....	40
3.3.3 Wholemoundarstellungen der untersuchten Transkriptionsfaktoren.....	44
3.3.4 Schnittdarstellungen.....	48
3.3.4.1 Paraxis.....	48

3.3.4.2 Pax3	52
3.3.4.3 MyoD.....	56
3.3.4.4 Pax1.....	60
3.3.4.5 Pax9.....	64
4 Diskussion.....	68
4.1 Einleitung.....	68
4.2 Einfluss auf die Sklerotomentwicklung.....	69
4.3 Einfluss auf die Dermomyotomentwicklung.....	71
4.4 Einfluss auf die Myotomentwicklung.....	73
4.5 Einfluss auf die Nierenentwicklung.....	75
5 Zusammenfassung.....	77
6 Summary.....	78
7 Ausblick.....	79
8 Erklärung.....	80
9 Abkürzungsverzeichnis.....	81
10 Literaturverzeichnis.....	86
11 Danksagung.....	96

1 Einleitung

Ein wichtiges Merkmal des Vertebratenkörpers ist sein segmentaler Aufbau, der sich im adulten Körper in der Wirbelsäule, den segmentalen Anteilen der Rumpfmuskulatur und dem peripheren Nervensystem widerspiegelt. Grundlage hierfür ist die metamere Gliederung des paraxialen Mesoderms in Form der Somiten. Für nahezu alle sie im Embryo umgebenden Gewebe sind Wechselwirkungen und Einflussnahmen auf ihre Entwicklung beschrieben, lediglich eine Struktur im intermediären Mesoderm, der Wolffsche Gang, ist bisher diesbezüglich nur wenig untersucht (Pourquie et al., 1996). In dieser Arbeit soll morphologisch und mit Hilfe von Genexpressionsmustern im Bereich der Somiten der Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenentwicklung untersucht werden.

1.1 Gastrulation

Die in der frühen Ontogenese stattfindende Gastrulation beginnt beim Vogel mit der Eiablage. Zu diesem Zeitpunkt liegt der Keimling als ein im zentralen Bereich einschichtiges Blastoderm einer Subgerminalhöhle auf, die ihrerseits an der Unterseite durch den Eidotter begrenzt wird (New, 1956). Diese Region wird als Area pellucida bezeichnet. In der Peripherie wird sie von der Area opaca begrenzt. Diese zeichnet sich durch fünf bis sechs übereinander liegende Zellschichten aus und bildet die Kontaktzone zum Eidotter. Zwischen den beiden Regionen liegt die schmale Marginalzone (Eyal-Giladi, 1997; Arendt and Nübler-Jung, 1999).

Die Zellen der Area pellucida bilden den Epiblasten, der die Grundlage für alle drei Keimblätter des Embryos darstellt. Nun kommt es aus der Region des Epiblasten zur Auswanderung einzelner Zellen in die Subgerminalhöhle, die den primären Hypoblasten in Form von Polyinvaginationsinseln bilden. Diese erfahren Unterstützung durch ein vom posterioren Rand des Blastoderms nach anterior auswachsendes Blatt, mit dem sie sich zum sekundären Hypoblasten verbinden, der die Basis für die Anlage der äußeren Embryonalhüllen wie Dottersack und Dottersackstiel darstellt. So liegt jetzt ein zweischichtiges Blastoderm aus Epi- und Hypoblast mit dazwischenliegendem Blastozöl vor, das am Rand in der Area opaca miteinander verbunden ist (Gilbert, 2000).

Das Hauptstrukturmerkmal der Gastrulation ist der Primitivstreifen, der sich zunächst als Verdickung des Epiblasten am posterioren Ende der Keimscheibe entwickelt (Spence et al., 1996). Diese entsteht durch Einwanderung entodermaler Vorläuferzellen epiblastischen

Ursprungs ins Blastozöl und erfährt Unterstützung durch Zellen aus der lateralen Region des posterioren Epiblasten, die in Richtung Zentrum wandern. Der Primitivstreifen elongiert mit Hilfe dieser einwandernden Zellen in die spätere Kopfregion (Gilbert, 2000).

Im Primitivstreifen bildet sich bald eine Einbuchtung, die so genannte Primitivrinne, die, genau wie die Primitivgrube im Primitivknoten am anterioren Ende des Primitivstreifens, als Eintrittspforte für ins Blastozöl einwandernde Zellen fungiert. Diese stammen aus dem Epiblasten und bilden, je nach Eintrittsort, die Grundlage des entodermalen und mesodermalen Keimblattes. So bilden durch den Primitivknoten einwandernde Zellen das Kopfmesoderm, die kraniale Chorda und den Vorderdarm, während die meisten endo- und mesodermalen Gewebe durch über den Primitivstreifen eingewanderte Zellen gebildet werden (Schoenwolf et al., 1992).

Die für diese Studie interessanten mesodermalen Anteile sind Teil einer über die genannten Strukturen einwandernden Zellpopulation, die sich in zwei Schichten aufteilt. Die untere Schicht bildet, nachdem sie die Hypoblastzellen von der Mitte ausgehend zur Seite geschoben hat, letztendlich die Organe entodermalen Ursprungs sowie den Hauptanteil der extraembryonalen Hüllen. Der zweite Anteil der Zellpopulation verteilt sich locker zwischen Epiblast und Entoderm und bildet die Grundlage der mesodermalen Gewebe. Die Einwanderung der mesodermalen Zellen setzt sich noch bis zur vollständigen Rückbildung des Primitivstreifens in der Analregion fort. Zu diesem Zeitpunkt sind die drei Keimblätter Ento-, Ekto- und Mesoderm dann vollständig ausgebildet (Gilbert, 2000). Aufgrund des vorhandenen antero-posterioren Entwicklungsgradienten bedingt durch die Bildung der Chorda und die Rückbildung des Primitivstreifens ist dieser Prozess aber immer nur abschnittsweise zu beobachten (Darnell et al., 1999).

1.2 Entwicklung des Mesoderm

Das sich zwischen Ektoderm und Entoderm befindende Mesoderm stellt anfangs eine morphologisch einheitlich erscheinende Platte dar, bevor sich seine Anteile bilateral-symmetrisch weiterentwickeln. So formiert sich neben dem aus dem Ektoderm hervorgehenden Neuralrohr und der darunterliegenden Chorda dorsalis beiderseits als breiter Streifen das paraxiale Mesoderm (Gilbert, 2000). An dieses schließt sich nach lateral das intermediäre Mesoderm an, daneben kommt das laterale Mesoderm zu liegen. Damit ist die Gastrulation mit der Bildung fünf mesodermaler Derivate abgeschlossen: der Chorda, dem

paraxialen Mesoderm, dem intermediären Mesoderm, dem Seitenplattenmesoderm und dem praechordalen Kopfmesoderm (Brand-Saberi et al., 1996).

1.2.1 Paraxiales Mesoderm

Das paraxiale Mesoderm liegt in kraniokaudaler Ausrichtung zwischen dem intermediären Mesoderm und dem Neuralrohr und berührt mit ventromedialen Anteilen die Chorda (Brand-Saberi et al., 1996). Es lässt sich entlang der cranio-kaudalen Körperachse in drei Anteile diversifizieren: das paraxiale Kopfmesoderm, das keine Segmentierung erfährt, die Somiten und die kaudal anschließende Segmentplatte. Die Somiten werden in kranio-kaudaler Sequenz in regelmäßigen ca. 90-minütigen Abständen über die Bildung von Somitomeren aus der Segmentplatte abgegliedert (Stockdale et al., 2000; Christ und Wilting, 1992; Christ und Ordahl, 1995; Denetclaw et al., 2000).

1.2.1.1 Somiten

Der Begriff „Somit“ wurde 1881 durch Balfour geprägt. Die Entdeckung erfolgte aber bereits durch Malpighi im 17. Jahrhundert (Balfour, 1881; Bothe et al., 2007).

Somiten sind sehr ursprüngliche und charakteristische Strukturen des Vertebratenembryos. Sie ermöglichen die Ausbildung eines durch stabilisierende und kontraktile Elemente gekennzeichneten Achsenskeletts und liefern die Grundlage für die Benennung der taxonomischen Gruppe der Vertebraten (Brand-Saberi et al., 1996). Hühnerembryonen bilden etwa 50 Somitenpaare aus.

Ihre Entstehung, die Fähigkeit zur sogenannten Segmentierung, ist ein rein intrinsisch gesteuerter Vorgang. Die Befähigung dazu wird möglicherweise durch die Passage der mesodermalen Zellen durch den Primitivknoten erworben (Christ et al., 1998). Die weitere Entwicklung jedoch erfolgt in Abhängigkeit von vielen unterschiedlichen Faktoren wie BMP4 und Noggin, aber auch Wnt's, Notch, Eph und Shh aus den umgebenden Geweben entlang der Körperachse (Takada et al., 1994; McMahon et al., 1998; Hrabe de Angelis et al., 1997; Araujo und Nieto, 1997; Palmeirim et al., 1997; Spence et al., 1996; Ikeya et al., 1998). Dieser Prozess ist damit stark extrinsisch gesteuert, wobei das durch Notch kontrollierte c-hairy-Gen mit dem nachgeordneten Faktor Lunatic Fringe als Regulator der „segmentation clock“, eines oszillierenden Prozesses zyklischer Genexpression, die Intervalle bestimmt (McGrew et al., 1998; Aulehla et Johnson, 1999; Palmeirim et al., 1997). Hox-Gene sorgen für die segmentale Identität (Burke, 2000; Kessel und Gruss, 1991).

Beim Huhn ist auch der Paired-Box-Transkriptionsfaktor *Pax2* am rostralen Ende des präsomitischen Mesoderm in den Segmentierungsprozess eingebunden. In dessen Verlauf kommt es auch bei *Pax2* zu einer zyklischen Veränderung der Expressionsmuster. So wird es immer zu Beginn der Segmentierung an der Segmentierungsgrenze exprimiert. Ein synergistisches Zusammenwirken mit *EphA4* und *Lunatic Fringe* ist ebenfalls beschrieben (Suetsugo et al., 2002).

Somiten sind, wie in Abbildung 1.1 ersichtlich, epitheliale Kugeln mit zentralem mesenchymalen Somitozöl und entstehen durch Kompaktierung und Epithelisierung von Zellen aus dem hochproliferativen kranialen Ende des paraxialen Mesoderm bilateral entlang der Körperachse (Schoenwolf, 2001; Dubrulle und Pourquoie, 2004; Brand-Saberi et al., 1996). Sie sind von einer Basalmembran umgeben, die die Verbindung zu den umgebenden Geweben wie Chorda, Neuralrohr, Ektoderm, der Aorta und dem Seitenplattenmesoderm darstellt, aber auch eine stabilisierende Funktion für den Somiten hat (Jacob et al., 1982; Christ et al., 1979). Der Kontakt zum intermediären Mesoderm mit dem Wolffschen Gang erfolgt über Zellkontakte (Christ et al., 1998). Somiten sind primär naiv, ihre Zellen in den frühen Stadien multipotent (Christ et al., 2004; Jacob und Christ, 1974; Christ et al., 1992; Aoyama, 1993).

1.2.1.2 Kompartimentierung der Somiten

Die Kompartimentierung der Somiten ist das erste Element der Regionalisierung der somitischen Zellpopulationen und ermöglicht die nachfolgende Differenzierung. So kommt es unter Signaleinfluss aus den umliegenden Geweben wie Chorda, Neuralrohr, Bodenplatte des Neuralrohres, Ektoderm und Seitenplattenmesoderm zur Spezialisierung der pluripotenten Zellen über unterschiedliche Zelllinien (Brand-Saberi et al., 1996; Brand-Saberi und Christ, 2000). Die entstehenden Gewebe, die Achsenbildung und auch die Beweglichkeit des Vertebratenkörpers sind dadurch eine Konsequenz der durch die Somiten schon früh gekennzeichneten Segmentierung (Goodrich, 1958; Christ et al., 1998; Christ et al., 1978; Suetsugo et al., 2002).

In dieser Studie lag, bedingt durch die in einem relativ frühen Stadium untersuchten Embryonen, das Hauptaugenmerk auf der frühen, dorso-ventralen Kompartimentierung. Diese erfolgt durch die im ventralen Somiten stattfindende epithelio-mesenchymale Transition (EMT) und die daraus folgende Bildung des Sklerotoms als Grundlage für das Achsenskelett einerseits (Jacob et al., 1975). Andererseits bleibt im dorsalen Somiten (Abbildung 1.2) die

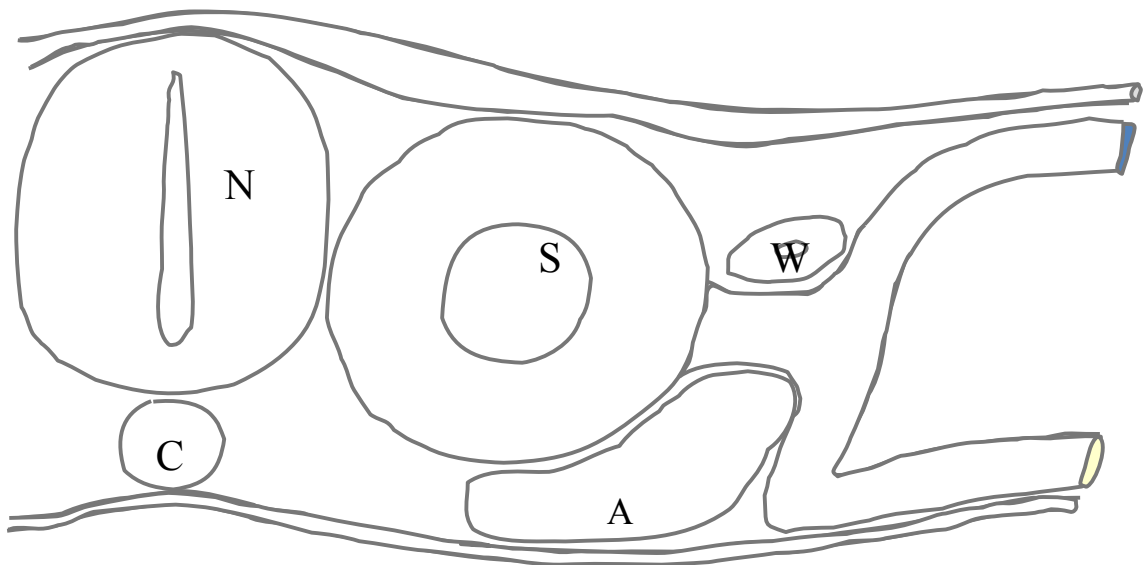


Abbildung 1.1: EM- und schematische Darstellung eines jungen, epithelialen Somiten, modifiziert nach Christ et al. (2004)(EM) und Geetha-Loganathan et al. (2006)(Skizze); W: Wolffscher Gang; S: Somit; N: Neuralrohr; C: Chorda dorsalis; A: Aorta

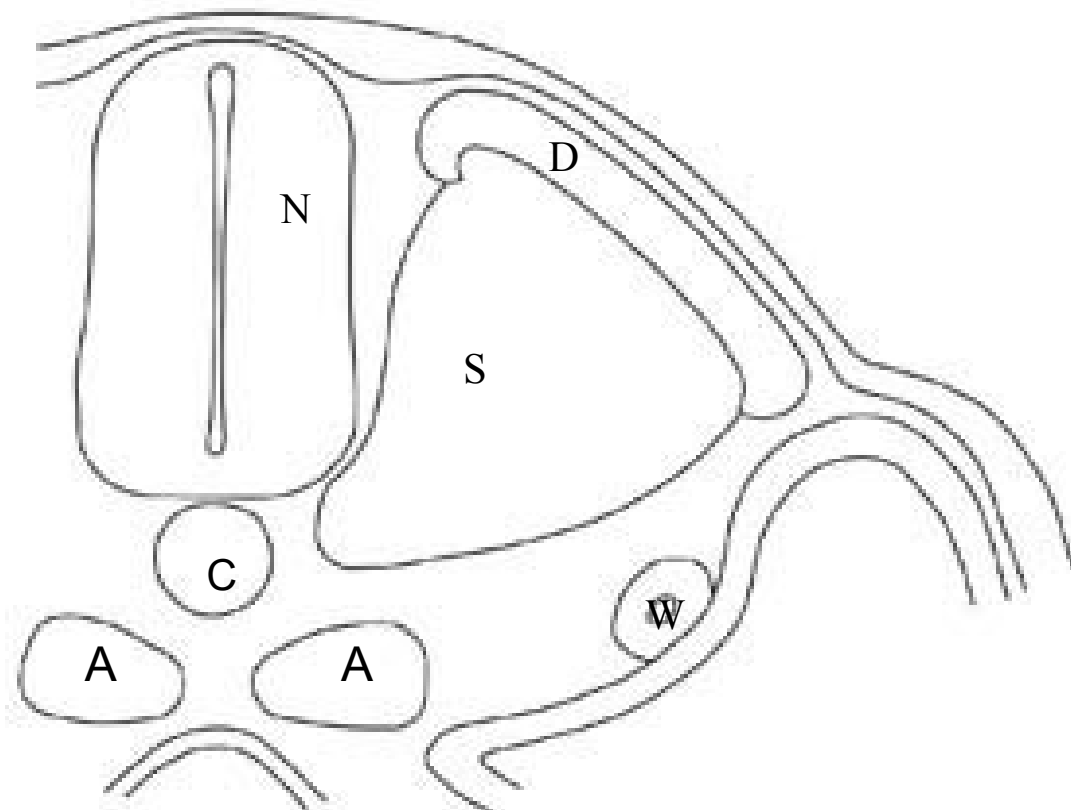


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines reifen, kompartimentierten Somiten, modifiziert nach Christ et al. (2004)(EM) und Geetha-Laganathan et al. (2006)(Skizze); W: Wolffscher Gang; N: Neuralrohr; S: Sklerotom; D: Dermomyotom; C: Chorda dorsalis; A: Aorta

epitheliale Struktur erhalten und das Gewebe wird, in Anlehnung an die daraus sich entwickelnden Derivate, Dermomyotom genannt. Aus Anteilen des Dermomyotom entsteht das Myotom, das sich zwischen Dermomyotom und Sklerotom einschibt und die Grundlage der Skelettmuskulatur des Rumpfes darstellt (Kaehn et al., 1988).

Steuerung der Kompartimentierung und Differenzierung

Die Spezifizierung und koordinierte Entwicklung der großen Variabilität der Somitenderivate ist von einem komplexen Zusammenspiel der umgebenden Strukturen abhängig: in einem morphogenetischen Feld „hängt das histologische Schicksal eines jeden Teils des Feldes von seinem topografischen Verhältnis zu anderen Teilen des Feldes ab“ (Holtfreter und Hamburger, 1955). Dieses wird interzellulär über sezernierte Signalmoleküle und intrazellulär über Transkriptionsfaktoren vermittelt und führt zu der oben genannten Kompartimentierung, die anhand von Expressionsmustern regulatorischer Gene, aber auch biochemisch auf Grund von zellspezifischen Proteinen sowie histologisch anhand der Zellanordnung sichtbar gemacht werden kann. Eine sehr grobe Übersicht der Einfluss nehmenden Faktoren findet sich in Abbildung 1.3.

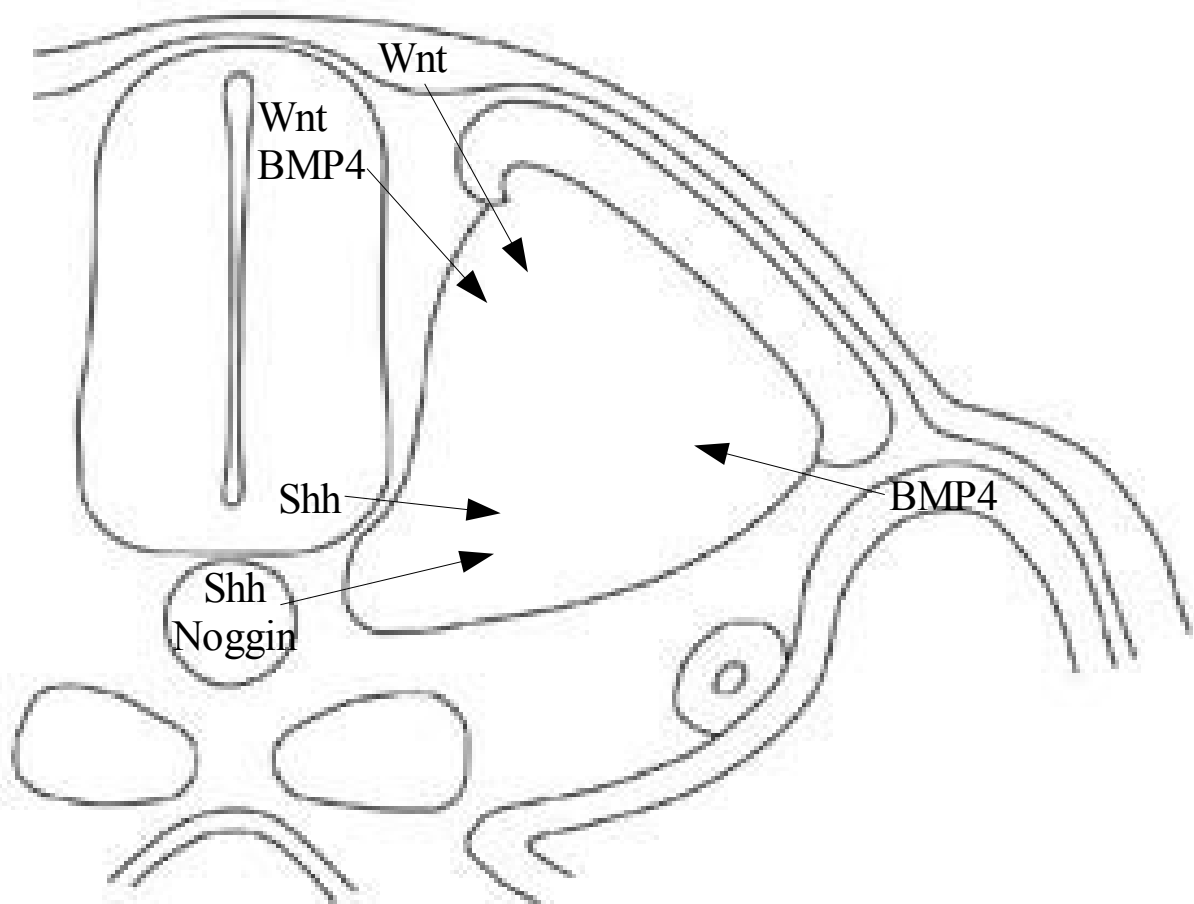


Abbildung 1.3: Grobe Übersicht der auf die Somitenentwicklung einflussnehmenden Faktoren

1.2.1.3 Gene und Transkriptionsfaktoren

Schon vor der Knospung der einzelnen Somiten wird das basische Helix-Loop-Helix-Protein (bHLH) *Paraxis* vom paraxialen Mesoderm exprimiert, das als Epithelisierungsfaktor dient (Burgess et al., 1996; Wilson-Rawls et al., 1999). Seine Lokalisation ist im weiteren Verlauf auf den dorsalen Somitenanteil, das Dermomyotom, beschränkt und dient auch dem Erhalt der Expression eines weiteren dermomyotomalen Markers, *Pax3*, im Dermomyotom und der Expression des bHLH-Proteins *MyoD* im darunterliegenden Myotom (Burgess et al., 1996; Wilson-Rawls et al., 1999).

Das zuvor erwähnte Gen *Pax3* gehört zu einer Familie von insgesamt neun „paired-box“-Genen, den sogenannten Pax-Genen. Diese sind Transkriptionsfaktoren und werden während der Embryonalentwicklung, aber auch später noch in charakteristischen Mustern exprimiert. Ihre Gemeinsamkeit ist die paired-box, eine DNA-bindende Domäne mit 120 Aminosäuren (Wallin et al., 1994; Balling et al., 1996; Suetsugu et al., 2002). Innerhalb dieser Familie gibt es Moleküle, die synergistisch wirken. So ergänzen sich *Pax1* und *Pax9*, *Pax3* und *Pax7* sowie *Pax2* und *Pax8* teilweise in ihrer Wirkung und ähneln sich auch im Aufbau stärker. Für verschiedene Pax-Gene ist ein Dosis-Wirkungszusammenhang beschrieben. Sie sind an einer Vielzahl von Organ- und Strukturentwicklungen maßgeblich beteiligt (Torres et al., 1995; Rothenpieler et al., 1993).

1.2.2 Sklerotombildung

Der Vorgang der Somitenreifung erfolgt in drei Achsen, der dorso-ventralen, der medio-lateralen und der kranio-kaudalen Achse. Veränderungen in der dorso-ventralen Achse sind bereits vier bis fünf Stunden nach Knospung der Somiten zu erkennen (Stockdale et al., 2000).

Die ventralen 2/3 des Somiten entwickeln sich über epithelio-mesenchymale Transformation (EMT) zum Sklerotom. Einbezogen werden auch die mesenchymal gebliebenen Zellen des Somitozöl. Der Begriff "Sklerotom" wurde 1880 von Hatschek geprägt und ist Hinweis auf die aus diesem Anteil entstehenden Knorpel, Knochen und Rippen des Achsenskeletts (Hatschek, 1880).

Die EMT im ventralen Somit geht einher mit einer Reduktion der apikalen Zell-Zell-Verbindungen, einer Erweiterung des Extrazellularraumes, Ausbildung von Filopodien und Einlagerung von Hyaluronsäure (Trelstad, 1977; Solursh et al., 1979), aber auch der Reduktion des für die Zelladhäsion wichtigen Zell-Zell-Adhäsionsmoleküls N-cadherin (Hatta

et al., 1987; Duband et al., 1987; Takeichi 1988). So entsteht ein lockerer, mesenchymaler Gewebzusammenhang, aus dem auch Zellen in den bisher zellfreien perichordalen Raum einwandern.

1.2.2.1 Gene in der Bildung und Differenzierung des Sklerotom

Bei der Bildung und Entwicklung des Sklerotoms ist nach heutigem Kenntnisstand noch einmal zwischen einem dorsalen und einen ventralen Anteil zu unterscheiden.

Initiator und verantwortlich für den Erhalt ist im ventralen Anteil Sonic hedgehog (Shh), ein von der Chorda dorsalis ausgehendes und im weiteren Verlauf durch zusätzliche Expression in der Bodenplatte des Neuralrohres verstärktes Signal, das mit Noggin, ebenfalls aus der Chorda dorsalis, kooperiert und über Gli2 und Gli3 die Sklerotombildung induziert (Buttitta et al., 2003; Brand-Saberi et al., 1996; Müller et al., 1996; Fan und Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994; Mc Mahon et al., 1998). Es führt zum Anstieg der schon im epithelialen Somiten nachweisbaren *Pax1*-Expression (Ebensperger et al., 1995; Balling et al., 1996, Deutsch et al., 1988). *Pax1* gehört, wie auch sein Synergist *Pax9*, zur Gruppe der "paired box"-Gene. Beide unterscheiden sich lediglich durch drei Aminosäuren in der "paired-box-Domäne" und zeigen ähnliche Expressionsmuster (Peters et al., 1999; Balling et al., 1996). Zudem haben sie in Geweben, in denen beide exprimiert werden, ähnliche Funktionen, wie z.B. antiapoptotische Eigenschaften, die Kontrolle der Zellproliferation, Verbesserung der Zelladhäsion und der mesenchymalen Kondensation in der frühen Sklerotomentwicklung und sind wie alle Pax-Gene einer Dosis-Wirkungs-Beziehung unterworfen (Peters et al., 1999). Beide sind sklerotomspezifische Markergene, die zur Untersuchung dieser Struktur herangezogen werden können (Barnes et al., 1996). Allerdings beginnt die Expression von *Pax1* etwas früher und es ist, wie an Knockout-Mäusen experimentell untersucht, in der Lage, ein Fehlen von *Pax9* vollständig zu kompensieren, während andersherum die Kompensation eingeschränkt ist (Peters et al., 1999). Sichtbar zu machen ist die Expression von *Pax1* zunächst im ganzen ventralen Somiten, konzentriert sich später jedoch auf den kaudalen Anteil des Somiten, insbesondere dessen mediale Hälfte (Ebensperger et al., 1995; Monsoro-Burq et Le Douarin, 2000). Die Expression von *Pax9* wird erst nach der EMT nachweisbar und beschränkt sich zum o.g. Zeitpunkt auf den latero-posterioren Abschnitt des Somiten (Balling et al., 1996; Müller et al., 1996).

Die Entwicklung des dorsalen Sklerotoms erfolgt deutlich später, die Steuerung erfolgt hier durch Signale aus dem Neuralrohr, der Nierenanlage und dem Seitenplattenmesoderm

(Monsoro-Burq et al., 1996). BMP4 sorgt in Wechselwirkung mit Shh für deutlich niedrigere bis nicht vorhandene *Pax1*- und *Pax9*-Spiegel, so dass die Entwicklung des dorsalen Sklerotoms unabhängig von diesen Faktoren zu sein scheint (Ebensperger et al., 1995; Watanabe und Le Douarin, 1996).

1.2.2.2 Sklerotomderivate

Das Sklerotom liefert das Anlagematerial des Achsenskeletts. So entstehen aus dem zentralen Sklerotom die ventralen Anteile der Neuralbögen, die Pedikel und der proximale Anteil der Rippen (Christ und Wilting, 1992; Brand-Saberi et al., 1996). Aus den Zellen des perichordalen Raumes als ventralem Sklerotom entwickeln sich Wirbelkörper und Zwischenwirbelscheiben (Töndury, 1958; Brand-Saberi et al., 1996). Das dorsale Sklerotom stellt die Grundlage der Dornfortsätze sowie des dorsalen Anteils der Neuralbögen dar (Peters et al., 1999; Monsoro-Burq et LeDouarin, 2000). Aus dem lateralen Sklerotom werden die distalen Rippen und Anteile der Sehnen konfiguriert (Huang et al., 2000; Brent et al., 2003). Bindegewebe in der Umgebung der Spinalganglien und Spinalnerven sowie Endo- und Perineurium entstehen aus dem Neurotom genannten, kranialen Anteil des Sklerotom (Rickman et al., 1985; Teillet et al., 1987; Halata et al., 1990). Auch die Meningen schließlich sind sklerotomalen Ursprungs (Halata et al., 1990).

1.2.3 Dermomyotombildung

Während der ventrale Anteil des Somiten sich durch EMT zum Sklerotom umwandelt, bleibt die epitheliale Struktur im dorsalen Anteil erhalten. Diese Kompartimentierung des Somiten und auch die folgende Regionalisierung ist nicht in-, sondern extrinsisch gesteuert. Die wichtigsten Faktoren in diesem Prozess sind das dorsale Neuralrohr und das Oberflächenektoderm, deren Signale das Dermomyotom per Diffusion erreichen. (Christ et al., 1992; Denetclaw et al., 2001).

1.2.3.1 Gene in der Bildung und Entwicklung des Dermomyotom

Die Spezifizierung des Dermomyotom erfolgt über sogenannte Wnt's, Glycoproteine, die als lokale Mediatoren wirken, indem sie nach Diffusion durch Bindung an spezifische Rezeptoren den β -Catenin-Gehalt im Zellinnern erhöhen und damit zur Aktivierung spezifischer Zielgene führen. Sie stammen aus dem dorsalen Neuralrohr und dem Ektoderm. (Denetclaw und Ordahl, 2000; Bothe et al., 2007; Brent et Tabin, 2002; Dhoot et al., 2001). Zusätzlich wird der ventralisierend wirkende Faktor Shh über das membrangebundene

Glykoprotein Gas1 geblockt, was zur Verhinderung der EMT im dorsalen Somiten beiträgt. (Lee et al., 2001).

Einer der wichtigsten Akteure in der Bildung und Entwicklung des Dermomyotom ist der oben genannte Transkriptionsfaktor *Paraxis*. Dieser reguliert und erhält die epithelialen Eigenschaften im dorsalen Drittel des Somiten. Er wird bereits in der Segmentplatte, aber auch in den neu gebildeten Somiten exprimiert, beschränkt sich dann aber nach der Kompartimentierung auf den Bereich des Dermomyotoms. Seine Expression wird durch Signale aus dem darüber liegenden Oberflächenektoderm induziert. *Paraxis* dient unter anderem der Regulation der Migration, Spezifizierung und Organisation von dermomyotomalen myogenen Vorläuferzellen, nicht aber deren Einwanderung ins Myotom. Es reguliert als Mediator der Signale aus dem Oberflächenektoderm die Expression von *Pax3* im Dermomyotom und damit wahrscheinlich auch die Zellproliferation (Wilson-Rawls et al., 1999).

Pax3 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der Pax-Gene. Es wirkt mitogen, reguliert die Zellmigration über einen Tyrosinkinase-Rezeptor und kann in dermomyotomalen Zellen und in migrierenden Zellen nachgewiesen werden (Wilson-Rawls et al., 1999)

Seine Expression wird durch axiale Strukturen über Wnt's induziert und erhalten und ist in geringer Menge schon in der Segmentplatte und in frühen Somiten vorhanden (Brand-Saberi et al., 1996; Galli et al., 2008). Auch das Seitenplattenmesoderm erhält über Bone Morphogenetic Protein (BMP)4, einen Wachstumsfaktor, der über Bindung an spezifische Membranrezeptoren zur Veränderung von Genaktivität führt, die *Pax3*-Expression aufrecht (Wilson-Rawls et al., 1999). Im weiteren Verlauf der Somitenreifung beschränkt sie sich dann auf den dorsalen epithelialen Anteil des Somiten bzw. letztendlich auf die dorsomediale und ventrolaterale Lippe des Dermomyotom und kann in diesem Sinne, so wie *Paraxis*, als dermomyotomaler Marker genutzt werden (Brand-Saberi et al., 1996; Bothe et al., 2007; Denetclaw und Ordahl, 2000).

1.2.3.2 Dermomyotomderivate

Das Dermomyotom stellt die Quelle der meisten mesodermalen Gewebe wie Muskulatur, Bindegewebe und Endothel sowie von Anteilen an Haut und Knorpel dar (Christ et al., 1977; Christ und Ordahl, 1995; Eloy-Trinquet et al., 2000; Psychoyos und Stern, 1996). Dies geschieht über myogene, fibrogene und angiogene Zelllinien (Brand-Saberi et al., 1996).

Die Ausbildung von Lippen an den Seiten des Dermomyotoms führt über „muscle determination factors“(MDF) zur Ausbildung des Myotom. Dabei entwickeln sich MDF-positive Zellen der dorsomedialen Lippe im thoracolumbalen Bereich zu epaxialen, die der ventrolateralen Lippe zu hypaxialen Muskelfasern (Denetclaw et al., 2000; Gros et al., 2004; Bothe et al., 2007). Das zentrale Dermomyotom ist Ursprung von Haut und Unterhautgewebe des Rückens (Mauger, 1972), sowie des sekundären, proliferativen Myotoms und der Satellitenzellen (Gros et al., 2005).

1.2.4 Myotombildung

Die o.g. Lippenbildung führt also letztendlich über Wachstum und Translokation der myogenen Zellen zur Myotombildung. Dabei ist das mediale Dermomyotom die Quelle der epaxialen myotomalen Zellen (Scaal und Christ, 2004).

So translozieren im dorsalen Dermomyotom *Pax3*-exprimierende Zellen nach ventral, elongieren, erwerben eine kranio-kaudale Ausrichtung und entwickeln sich letztendlich zu myotomalen Myocyten (Gros et al., 2004).

1.2.4.1 Gene in der Bildung und Entwicklung des Myotom

Die Myogenese ist abhängig von MDF's und beginnt, wenn Zellen anfangen, *MyoD* zu exprimieren, den, beim Huhn, wichtigsten MDF (Denetclaw und Ordahl, 2000). Diese wandern dann als Muskelvorläuferzellen unter das Dermomyotom (Denetclaw und Ordahl, 2000; Denetclaw et al., 2001; Scaal und Christ, 2004; Bothe et al., 2007). *MyoD* gehört zu einer Familie basischer Helix-Loop-Helix-Proteine - zu der u.a. auch Myf5, Myf6 und Myogenin gehören - die die Skelettmuskeldifferenzierung und -spezifizierung koordiniert (Tapscott und Weintraub, 1991; Tapscott, 2005). Es wurde 1979 erstmals entdeckt und 1987 als cDNA kloniert (Taylor und Jones, 1979; Davis et al., 1987). Mit dem Faktor Myf5 substituiert es sich partiell. Beide werden für die Bildung myogener Zelllinien benötigt, wobei *MyoD* eine frühe Expression im hypaxialen Myotom aufweist, während die von Myf5 im frühen epaxialen Myotom zu finden ist (Wilson-Rawls et al., 1999; Sartorelli et al., 1997; Kablar et al., 1998). *MyoD* kann muskelspezifische Gene aktivieren, das myogene Programm starten und andere Zelltypen supprimieren (Tapscott und Weintraub, 1991). Seine Expressionslevel fluktuieren während eines jeden Zellzyklus (Galli et al., 2008).

MyoD wird durch unterschiedliche Gene in einem sensiblen Gleichgewicht reguliert (Scaal et Christ, 2004), dazu gehört Shh aus Chorda und Bodenplatte des Neuralrohres, das die *MyoD*-Expression im epithelialen Somiten initiiert und damit die Proliferation und Verhinderung

von Apoptose ermöglicht. Unterstützung erhält es von BMP4 aus dem Seitenplattenmesoderm (Brand-Saberi et al., 1996; Tapscott, 2005), wohingegen Notch die *MyoD*-Transkription und -aktivität senkt (Kopan et al., 1994). Auch Wnt's aus Neuralrohr und Ektoderm sind an der Regulation von *MyoD* beteiligt (Cossu und Borello, 1999).

1.2.4.2 Myotomderivate

Das mediale Dermomyotom führt über Myotombildung zur Entwicklung der epaxialen, also der autochthonen Rückenmuskulatur, während aus dem lateralen Dermomyotom über das Myotom die hypaxiale Muskulatur entsteht, die die ventrolaterale Rumpfwandmuskulatur sowie die Extremitätenmuskulatur bildet (Bothe et al., 2007; Scaal und Christ, 2004).

1.2.5 Intermediäres Mesoderm

Das intermediäre Mesoderm zeigt sich zu Beginn der Entwicklung als schmaler Streifen undifferenzierten Mesoderms zwischen dem paraxialen und dem lateralen Mesoderm (Hiruma und Nakamura, 2003). Aus ihm entsteht der Wolffsche oder (meso)nephrische Gang, der essentiell ist für die Entwicklung von Niere und Ureter, aber auch der männlichen Samenwege (Romanoff, 1960; Obara-Ishihara et al., 1999; Grote et al., 2005; Hannema und Hughes, 2007).

1.2.5.1 Der Wolffsche Gang

Schon in frühen embryologischen Studien wird der Wolffsche Gang als aus dem intermediären Mesoderm hervorgehender solider Zellstrang beschrieben (Fürbringer, 1878, Mihalcovics, 1885, zitiert nach Romanoff, 1960). Der Zeitpunkt der Strangbildung wird in älteren Arbeiten um das 8-Somiten-Stadium beschrieben (Romanoff, 1960), Hiruma und Nakamura stellten allerdings bereits bei einem 5-Somitenstadium (HH 8+) eine Anlage in Form eines feinen Bandes über den Bereich dreier Somiten (6. bis 8.) fest (Hiruma und Nakamura, 2003).

Dieser Zellstrang wird im Stadium HH 9 deutlicher, erstreckt sich aber noch über den gleichen Abschnitt. Im Stadium HH 9+ wächst er spindelförmig nach kaudal aus und verlängert sich deutlich, so dass er die Länge von 6 Somiten (6. bis 11.) überspannt. Er erreicht im Stadium HH 10 das Ausmaß von 7 Somiten (6. bis 12.) und ist nun als Zellstrang deutlicher erkennbar. Im Stadium HH 11 beginnt sich der Zellstrang in einen dorsalen und einen ventralen Anteil zu separieren, wovon der dorsale als Wolffscher Gang verbleibt und in Stadium HH 12 durch weiteres extensives Wachstum bereits den Bereich des noch zu

bildenden 18. Somiten erreicht. Der ventrale Anteil beginnt sich im Stadium HH 14 zu Tubuli umzubilden (Hiruma und Nakamura, 2003). Die Lumenbildung des Ganges beginnt im Stadium HH 12, ab HH 13 existiert ein kontinuierliches Lumen im dorsalen Anteil und der Wolffsche Gang verlagert sich ventrolateral neben die Aorta (Hiruma und Nakamura, 2003).

Der Wolffsche Gang wächst durch Mitose und Zellmigration nach kaudal aus. Er hat letztendlich drei Anteile: den kanalisierten Bereich auf Somitenhöhe, der eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) durchgemacht hat und nun ein Rohr mit Basalmembran und apikobasal polarisierten Zellen bildet, den Übergangsbereich, der als solider Zellstrang gut von der Umgebung abgrenzbar ist, aber keine Basalmembran hat, und die mesenchymale Spitze. Hier sind die Zelllängsachsen kranio-kaudal angeordnet, eine Basalmembran ist nicht vorhanden, dafür aber filopodien- und lamellipodienartige Auswüchse der Zellen, die auf Migrationsverhalten hinweisen (Jacob und Christ, 1978; Jacob et al, 1978; Jacob et al, 1991). Auch weist die Spitze einen deutlich höheren Mitoseindex auf (Jacob und Christ, 1978), was in Kombination mit dem Migrationsverhalten der Zellen das schnelle Wachstum des Wolffschen Ganges in Richtung der Kloake erklärt. Bei Entfernung dieser Spitze stagniert das Auswachsen des Wolffschen Ganges, jedoch sind theoretisch alle Anteile des Ganges zum Wachstum befähigt. Dies impliziert den Einfluss extrinsischer Faktoren auf die Elongation des Wolffschen Ganges in Richtung der Kloake (Jacob und Christ, 1978). Einer dieser Faktoren ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, Fibronectin. Es findet sich auf der Oberfläche des unsegmentierten paraxialen Mesoderms, aber auch in den Basallaminae von Somiten und Wolffschem Gang. Es stellt die Voraussetzung zum Auswachsen des Wolffschen Ganges dar, bei Fehlen kommt es zur Stagnation. Unterstützend wirkt Laminin, das eine richtungsweisende Wirkung hat. So ist das Zusammenspiel der extrazellulären Matrix mit der Wachstumszone des Wolffschen Ganges für dessen gerichtetes Wachstum essentiell (Jacob et al., 1991).

Steuerung der Entwicklung des Wolffschen Ganges

Interaktionen zwischen dem Seitenplattenmesoderm, dem Ektoderm, dem paraxialen Mesoderm und dem intermediären Mesoderm sind von großer Bedeutung für die Bildung des Wolffschen Ganges und initialisieren die Entwicklung des Urogenitaltraktes.

Die Entfernung des Ektoderms hat zwar keinen Einfluss auf die kaudale Migration von Progenitorzellen und damit auf das Auswachsen des Wolffschen Ganges, wohl aber auf

dessen Differenzierung: Tubulogenese und weitere Nephrogenese werden unterdrückt (Obara-Ishihara et al., 1999).

Als ein vom Ektoderm ausgehendes Signal wurde BMP4 ermittelt. Durch BMP4-Expression im Ektoderm kommt es im Seitenplattenmesoderm zu einem positiven Feedback und damit verbunden dort ebenfalls zu einem Anstieg der BMP4-Produktion. Nachgeordnet reguliert dann *Pax2* die Entstehung und Differenzierung des Wolffschen Ganges. Ein früher Initiator dieses Vorgangs scheint das paraxiale Mesoderm zu sein (Mauch et al., 2000). Folgend emigrieren *Pax2*-positive Zellen nach kaudal, worauf die Differenzierung in ein epitheliales Rohr folgt (Obara-Ishihara et al., 1999).

Von Bodo Christ und Kollegen wurde eine „Wachstumszone“ im Seitenplattenmesoderm auf Höhe der Epithelisierungszone im paraxialen Mesoderm mit Einfluss auf die Entwicklung des Wolffschen Ganges vermutet (Jacob et al., 1991).

1.2.5.2 Gene und Transkriptionsfaktoren

Wie schon in der Entwicklung der Somiten beschrieben, sind auch in der Differenzierung des intermediären Mesoderms Pax-Gene von entscheidender Bedeutung. Zu nennen sind die eng verwandten Gene *Pax2* und *Pax8*. Sie gehören wie *Pax1*, *Pax3*, *Pax7* und *Pax9* zu einer Familie morphogenetischer Regulationsgene, die für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren codieren (Rothenpieler et al., 1993). Sie sind essentiell für die Initiierung der Bildung von Pro- und Mesonephros und der daraus folgenden Nierenentwicklung (Grote et al., 2005). Gemeinsam regulieren sie *Gata3*, ein für die Proliferation, Morphogenese und das gerichtete Auswachsen des Wolffschen Ganges bedeutsames Gen, bei dessen Fehlen es zur Bildung multipler ungeordneter Gänge mit ungerichtetem Wachstum kommt (Grote et al., 2005).

Vor allem *Pax2* wird für viele Schritte in der Bildung (EMT) und Differenzierung aller epithelialen Strukturen aus dem intermediären Mesoderm benötigt (Torres et al., 1995; Rothenpieler et al., 1993). Es hat antiapoptotische Eigenschaften (Woolf und Welham, 2002), wird im Wolffschen Gang und im nephrogenen Mesenchym exprimiert und stellt den frühesten Regulator der Nierenentwicklung dar (Torres et al., 1995). Wahrscheinlich obliegt ihm die Regulation von nachgeordneten Genen, die für die Zellaggregation und -polarisierung und damit für die Epithelbildung benötigt werden (Rothenpieler et al., 1993). Ohne *Pax2* fehlt die Anlage von Nieren, Ureteren und den aus dem intermediären Mesoderm gebildeten Anteilen der männlichen Geschlechtsorgane (Joseph et al., 2009; Obara-Ishihara, 1999).

Seinerseits erfährt es Kontrolle durch das schon o.g. BMP4, aber auch Emx2 ist an der Regulation beteiligt (Miyamoto et al., 1997).

Pax2 ist außerdem als eines der ersten Gene im metanephrischen Mesenchym von entscheidender Bedeutung für die spätere Konversion und Differenzierung des Nierenmesenchyms zu Epithel (Miyamoto et al., 1997). Hier kommt es zu einem Zusammenspiel mit WT1, das für die Antwort des noch nicht induzierten metanephrischen Mesenchyms verantwortlich ist: ohne WT1 wird keine Ureterknospe ausgebildet (Torres et al., 1995).

Bei Säugern wird *Pax2* im Wolffschen und im Müllerschen Gang exprimiert (Torres et al., 1995) und ist, auch beim Vogel, außerdem an der Entwicklung von Auge, Ohr und Gehirn beteiligt (Obara-Ishihara et al., 1999).

1.2.5.3 Derivate des Wolffschen Ganges

Aus dem Wolffschen Gang entstehen Teile der tubulären epithelialen Gewebe von Niere und männlichem Genitale: der Nebenhoden, der Samenleiter, die Ureteren und die Sammelrohre der Niere (Obara-Ishihara et al., 1999, Romanoff, 1960). Der Nebenhoden entsteht aus dem kranialen Anteil des Wolffschen Ganges und hat letztendlich fünf Anteile: ein initiales Segment, Caput, Corpus, Cauda und Vas deferens. In ihm erwerben die Spermatozoen die Fähigkeit zur Ovotaxis und Befruchtung (Joseph et al., 2009).

1.3 Nomenklatur

Um die Entwicklung von Hühnerembryonen für Vergleichszwecke sinnvoll einteilen zu können, wurde 1951 von Hamburger und Hamilton (HH) ein Schema entwickelt, das die Morphologie des Embryos und die Anzahl der gebildeten Somitenpaare berücksichtigt (Hamburger und Hamilton, 1951). So ist, unabhängig von Bebrütungsdauer, Umgebungsbedingungen und dem Alter der Eier immer ein direkter Abgleich zwischen mehreren untersuchten Embryonen gleichen Stadiums möglich. Diese Nomenklatur sieht eine Einteilung in drei Klassen vor: die presomitischen Stadien von HH 1 bis HH 6 und einer Bebrütungsdauer von ca. 24 Stunden, die somitischen Stadien von HH 7 bis HH 14 mit bis zu 53 Stunden Bebrütungszeit und die Stadien mit Kennzeichnung durch externe Strukturen, die die Stadien HH 15 bis HH 46 betreffen, und den größten Teil der Entwicklung bis zum Schlupf abdecken.

Die in dieser Studie zu Untersuchungszwecken herangezogenen Stadien sind also nach der HH -Nomenklatur durch externe Strukturen gekennzeichnet. So ist für das Stadium HH 15 ein spitzer Winkel zwischen Tel- und Diencephalon erkennbar, eine dritte Kiemenspalte zeichnet sich ab, die Somitenanzahl beträgt 24 bis 27 Paare. Das Stadium HH 16 mit 26 bis 28 Somitenpaaren ist durch die sich bis zwischen dem 10. und 18. Somitenpaar ausdehnende Amnionhülle geprägt. In Stadium HH 17 beginnt die Bildung der Extremitätenknospen, der Embryo hat 29 bis 32 Somitenpaare. Das (fast) geschlossene Amnion ist das wichtigste Kriterium für das Stadium HH 18 mit 30 bis 36 Somitenpaaren. Im Stadium HH 19 mit 37 bis 40 Somitenpaaren tritt die vierte Kiemenspalte in Erscheinung, die Augen sind deutlich zu sehen, aber noch unpigmentiert.

1.4 Wissenschaftliche Fragestellung

Die Interaktion der verschiedenen Keimblätter und ihrer Derivate in der Ontogenese ist schon lange bekannt und schon seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Besonders die seit einigen Jahren zugängliche molekulare Ebene ermöglicht einen tiefen Einblick in grundlegende Prozesse der Vertebratenentwicklung.

Es ist ein Einfluss nahezu aller umgebenden Gewebe auf die Entwicklung und Reifung der Somiten bekannt. Lediglich das intermediäre Mesoderm ist im Hinblick auf diese Fragestellung bisher nur unzulänglich untersucht. In früheren Daten aus unserer Arbeitsgruppe (Kathrin Heim, Dissertation 2011) fiel jedoch im Bereich der ventralen Somiten der kaudalen Rumpfabschnitte eine nach ventrolateral, also zum Wolffschen Gang gerichtete, erste „Auflösung“ der epithelialen Somiten und damit beginnende Bildung des Sklerotoms auf.

So sollte in dieser Arbeit ein möglicher Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenentwicklung untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Wachstumsknospe des Wolffschen Ganges mikrochirurgisch entfernt und es wurden nach Reinkubation der operierten Embryonen die Folgen dieses Eingriffs auf die Somitenentwicklung anhand von Semidünnschnitten und der Expression von Markergenen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Gegenstand der Untersuchung war das Thorakolumbalsegment, da nach der zervikothorakalen Exstirpation des Wolffschen Ganges in diesem Abschnitt eine durch das Fehlen des Wolffschen Ganges bedingte unmittelbare Auswirkung erwartet wurde. Als Kontrolle wurde jeweils die bilateral-symmetrische nicht operierte Seite desselben Embryos genutzt. Die unabhängige Entwicklung beider symmetrischer Hälften wird in der Literatur beschrieben, wobei die Chorda als grenzgebendes Signal vermutet wird (Klessinger und Christ, 1996).

Zur Darstellung der Zellmorphologie im Somiten wurden transversale Semidünnschnitte angefertigt. Der Nachweis des korrekten Vorgehens in der Operation wurde durch *Pax2*-Expressionsmuster, die in diesem Bereich auf den Wolffschen Gang und das nephrogene Mesenchym beschränkt sind, mit Hilfe von Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung dargestellt.

Die Darstellung der Wirkung des Fehlens des Wolffschen Ganges auf die einzelnen Somitenkompartimente erfolgte mit dem Verfahren der *in situ*-Hybridisierung. So wurde der Bereich des lateralen Sklerotom mit Hilfe der *c-Pax9*-Sonde sichtbar gemacht, der des medialen durch *c-Pax1*. Mittels *q-Pax3* und *c-Paraxis* erfolgte die Darstellung des Dermomyotom und des Prozesses der Epithelialisierung. *c-MyoD* kennzeichnet das sich daraus entwickelnde Myotom. Es wurden im Fall von *Paraxis* n=3 Embryonen untersucht. Für *Pax3*, *MyoD*, *Pax2* und *Pax9* waren es jeweils n=4. Für *Pax1* umfasst das Probenvolumen n=5.

2.2 Embryonen

Befruchtete White Leghorn-Eier der Firma Produits agricoles Haas, Kaltenhouse, Frankreich wurden bei 76% relativer Luftfeuchte und einer Temperatur von 37,8°C liegend bis zum benötigten Stadium bebrütet (Brutschrank der Firma Grumbach, Asslar). Die Stadien wurden nach der Nomenklatur von Hamburger und Hamilton aus dem Jahre 1951, im Weiteren HH genannt, klassifiziert. Die in dieser Arbeit untersuchten Embryonen hatten zum Zeitpunkt der Operation ein Alter von 47,5 bis 58 Stunden erreicht und ein Nomenklaturstadium von HH 8-9 bis HH 13. Zum Zeitpunkt der Untersuchung hatte eine weitere Bebrütung über 16,5 bis 21 Stunden stattgefunden und es waren Stadien von HH 15 – 16 bis HH 19 vorhanden.

2.3 Mikrochirurgie

2.3.1 Vor-und Nachbereitung

Bei allen Manipulationen an Embryonen - Operation, Präparation, Fixierung, Einbettung, *in situ*-Hybridisierung, Immunhistochemie - wurden industriesterile Einmalhandschuhe (Peha Soft, Hartmann) verwendet.

Vor dem Eingriff erfolgte eine Reinigung des Arbeitsplatzes mit 0,1% SDS und eine Desinfektion mit 70% Ethanol. Es wurden ausschließlich sterile Edelstahl-Instrumente oder sterile Einmalartikel aus Kunststoff verwendet, die nach Gebrauch gereinigt und sterilisiert bzw. verworfen wurden.

Vor der Operation wurde die Lokalisation der Keimscheibe im Ei mit Hilfe einer Durchsichtlampe bestimmt und auf der Schale vermerkt. Danach wurde die Eierschale mit 70% Ethanol desinfiziert und das Ei in ein Nestchen aus einer mit Aluminium ummantelten und mit einem Tupfer abgepolsterten Petrischale (Falcon) gesetzt. Nun erfolgte eine Absaugung von ca. 2 ml Eiklar mittels 2ml-Spritze und Kanüle (Sterican, Braun) am stumpfen Pol des Eis über die Luftkammer, um ein Absinken des Embryos zu erreichen. Mit einer feinen Säge wurde danach die Eischale bis zur Schalenhaut durchtrennt und ein Fensterchen von 0,5 cm im Quadrat entfernt, dann mit einer stumpfen Pinzette die Schalenhaut im Bereich des Fensterchens nach Aufbringen eines Tropfens Locke-Lösung mit Penicillin (Locke und Rosenheim, 1907), um den eventuell anhaftenden Embryo abzusenken und Verletzungen zu vermeiden, penetriert und beseitigt. Der abgesenkte Embryo wurde daraufhin mittels 2-3 ml Locke-Lösung auf das Niveau des Fensterchens angehoben.

Die Operationen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskopes (Leica MZ 9,5) durchgeführt.

Zur Vorbereitung der Operation und Darstellung der Vitellinmembran wurde diese vorsichtig mit einem Färbestift aus einem mit einer Mischung aus Agarose und Nilblau beschichteten kugelförmig ausgezogenen Glasröhrchen angefärbt und mittels durch Elektrolyse geschärfter Tungsten-Nadeln (Durchmesser 0,5 mm, Elektrolyse in 0,5 molarer KOH bei 12 Volt) über dem gesamten Embryo vorsichtig durchtrennt und zur Seite präpariert. Die verwendeten Nadeln wurden während der Manipulation fortwährend mittels einer Ethanol-Flamme von Eiweiß- und anhängenden Geweberesten befreit und sterilisiert.

Nach der Operation wurden 2 ml Eiklar mittels Kanüle und Spritze über die zuvor geschaffene Öffnung am stumpfen Eipol abgesaugt, um den Embryo wieder abzusenken, und der Embryo zur Verhinderung der Austrocknung mit einigen Tropfen Locke-Lösung

beträufelt. Das Ei wurde hernach mittels medizinischem Klebeband (Ethibond 3 M, Ethicon) verschlossen und bis zum Erreichen der untersuchten Stadien liegend mit nach oben gerichtetem Fenster bei den oben genannten Bedingungen weiter bebrütet.

2.3.2 Operation

Es wurden Embryonen der Stadien HH 8+ bis HH 15, mit dem Hauptaugenmerk auf HH 10 bis HH 12 und HH 13, operiert, da in diesem Stadium die Knospe des Wolffschen Ganges am Sichersten in toto entfernt werden konnte. Die Bestimmung des Stadiums und das Zählen der Somitenpaare erfolgte nach einem ersten Anfärben des Embryos mit den oben genannten Färbestiften, was eine Blaufärbung des Ektoderms und ein Durchschiern der darunter liegenden Strukturen zur Folge hatte.

Das Ektoderm wurde daraufhin mithilfe einer geschärften Tungsten-Nadel parallel zur Somitenreihe bzw. dem noch unsegmentierten paraxialen Mesoderm über die von Hiruma und Nakamura, 2003 beschriebene benötigte Distanz mit geradem Schnitt durchtrennt und vorsichtig ohne weitere Verletzung nach lateral präpariert. Ein erneuter Einsatz des Färbestiftes machte die darunter liegenden Strukturen deutlicher sichtbar. Die so dargestellte mesenchymale Spitze des Wolffschen Ganges wurde nun mittels geschärfter Tungsten-Nadel vorsichtig aus dem umgebenden Gewebe unter Schonung der Gefäße und des nephrogenen Mesenchyms herausgelöst und, wie im Abschnitt 2.3.7 in Anlehnung an Hiruma und Nakamura, 2003 zusammengefasst, je nach Stadium über 1 bis zwei vollendete sowie 3 bis 5 noch zu formende Somiten entfernt. Der OP-Situs ist beispielhaft in den Abbildungen 2.1 und 2.2 dargestellt. Das zur Seite verlagerte Ektoderm wurde daraufhin soweit möglich replaziert und der Embryo nach Absenkung und Bedeckung mit Locke-Lösung (s.o.) für 16,5 bis 21 Stunden reinkubiert.

2.3.3 Präparation

Zum Zeitpunkt der Präparation hatten die Embryonen ein Alter von 2,5 bis 4 Tagen sowie je nach Operationsstadium HH -Stadien von 14 bis 20 erreicht (s. a. Kapitel 2.3.8).

Vor der Öffnung des Eis wurde der Embryo mit der o.g. Methode wieder vorsichtig abgesenkt, um Verletzungen zu verhindern. Bei Eröffnung des Eis im Bereich des abgeklebten Fensters mit Hilfe einer feinen Augenschere (Aesculap) wurde die sich darunter befindende Keimscheibe mit dem zentral liegenden Embryo sichtbar. Diese wurde nun mittels einer Iridektomieschere (Aesculap) aus dem Zusammenhang mit der Dotterkugel gelöst und

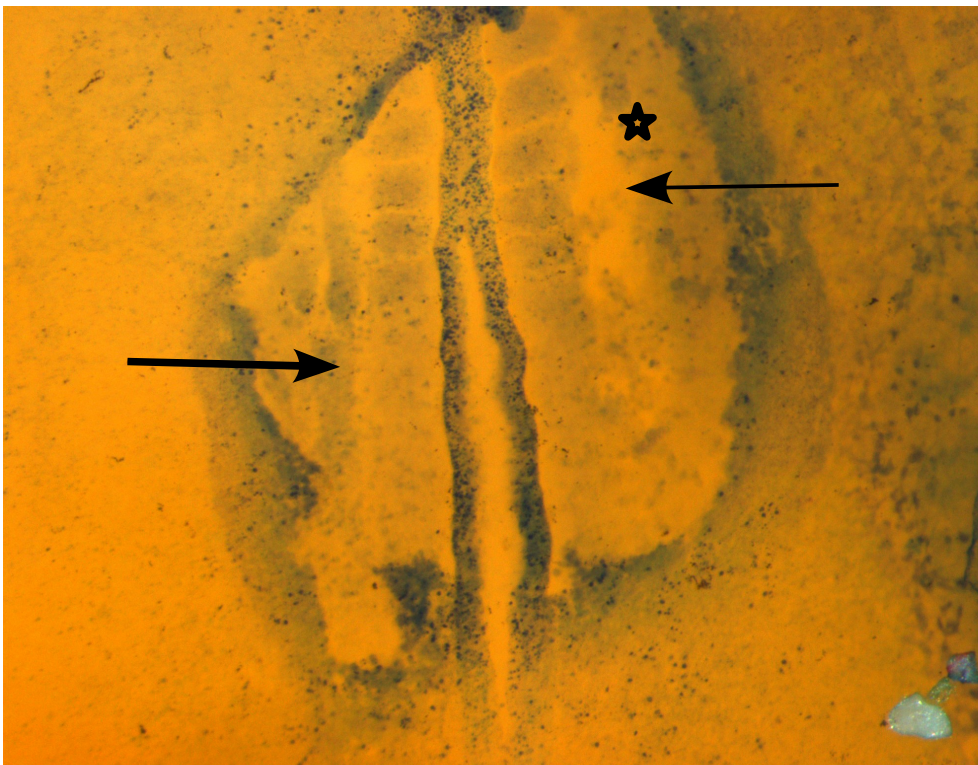


Abbildung 2.1: OP-Situs eines HH 9-Embryos; dicker Pfeil: nicht ablatierter Wolffscher Gang auf der linken Seite; dünner Pfeil: fehlende Struktur des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite; Sternchen: Beginn der Ablationsstelle. Auflichtmikroskop, Vergrößerung 15-fach



Abbildung 2.2: OP-Situs; Darstellung des intakten Wolffschen Ganges auf der rechten Seite eines HH 14 Embryos. Das Ektoderm wurde aufgeschnitten und zur Seite präpariert. Auflichtmikroskop, Vergrößerung 12-fach

mittels eines kleinen Sieblöffels (Aesculap) in eine mit gekühlter Waschlösung (PBS, 1%) gefüllte Petrischale (Falcon) überführt. Nach vorsichtiger Reinigung von Dotterresten wurde die saubere Keimscheibe nun in eine zweite Petrischale mit Waschlösung übertragen. Die Amnionhülle wurde mittels zweier scharfer Pinzetten (Dumont) eröffnet und der Embryo mit Hilfe einer feinen Iridektomieschere bzw. zweier Pinzetten aus der Keimscheibe sowie von Resten der Amnion- und Vitellinmembran befreit. Nun erfolge die Zählung der Somiten sowie die Einordnung in die HH -Nomenklatur.

2.3.4 Fixierung und Einbettung

2.3.4.1 Fixierung für *in situ*--Hybridisierung

Die Fixierung der Embryonen für die *in situ*-Hybridisierung erfolgte am vorher mit 0,1% SDS gereinigten Arbeitsplatz unter Verwendung von Einmalhandschuhen, um Kontamination mit mRNasen zu verhindern. Die präparierten Embryonen wurden mittels steriler Einmalpipette (Einmal-Pasteur-Pipette, Roth) in mit 4% RNase-freiem Paraformaldehyd (PfA) in PBST gefüllte RNase-freie 1,5 bzw. 2 ml Self-Lock-Eppendorfgefäße (Eppendorf) überführt und bei 4°C über Nacht fixiert und gekühlt. Eine Langzeitfixierung erfolgte am folgenden Tag mittels Dehydrierung durch eine RNase-freie aufsteigende Methanolreihe (25%, 50%, 75%, 100%) und anschließende RNase-freie Aufbewahrung bei -20°C.

2.3.4.2 Fixierung und Einbettung für Immunhistochemie

Zur Fixierung der Embryonen für die immunhistochemische Darstellung wurden die präparierten Embryonen unter den oben genannten Bedingungen in mit Serra-Lösung (Serra, 1946) gefüllte Eppendorfgefäße gebracht und über Nacht bei 4°C fixiert und gekühlt. Am nächsten Tag erfolgte eine Dehydrierung mittels ansteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) sowie 2-mal Rotihistol für jeweils eine Stunde.

Dieses wurde in mehreren Waschschritten mit Paraffin (65°C, 2-mal eine Stunde, dann über Nacht) herausgelöst und die Embryonen wurden am darauf folgenden Tag mit Hilfe einer Einbettungsmaschine (Leica EG 1150H) in Paraffin eingebettet.

2.3.4.3 Fixierung und Einbettung für Semidünnschnitte

Die Fixierung der Embryonen für Semidünnschnitte erfolgte wie für *in situ*-Hybridisierung in 4% PfA/PBST, eine Langzeitkonservierung in Methanol war möglich. Vor der weiteren Aufarbeitung erfolgte allerdings eine Rückführung in PfA/PBS.

Die isolierten und in PFA/PBS aufbewahrten Embryonen wurden in dicht schließende Glasgefäße überführt und 4-mal 5 Minuten in PBS gewaschen. Nun wurde die Waschlösung durch eine 0,5% Osmium/PBS-Lösung ersetzt, welche 15 Minuten bei geschlossenem Deckel belassen wurde, und zu einer leichten Braunfärbung und damit besseren Darstellung des Embryos und seiner Strukturen im Epoxidharz führt. Nun folgten mehrere 10-minütige Waschschrte in Aqua bidest., um das Osmium herauszuwaschen. Eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 60%, 70%) führte zu einer allmählichen Dehydrierung. Die so behandelten Embryonen wurden über Nacht bei 4 °C in dicht verschlossenen Gefäßen gelagert.

Am folgenden Tag wurde die Dehydrierung fortgesetzt (80%, 90%, 95%, 3 x 100%), und die Embryonen wurden mit Propylenoxid (Polysciences) auf die Einbettung in Kunstharz (Durcupan, Sigma) vorbereitet. Dazu erfolgte eine 2-mal 10-minütige Waschung in reinem Propylenoxid, bevor dieses im Verhältnis 2:1 mit Durcupan vermischt zugesetzt wurde. Nach einer Stunde wurde diese Mischung durch eine 1:2-Mischung Propylenoxid:Durcupan ersetzt, nach einer weiteren Stunde wurde der Deckel entfernt, um das flüchtige Propylenoxid eine weitere Stunde ausdampfen zu lassen. Der letzte Waschschrte erfolgte nun in reinem Durcupan über Nacht, bevor am nächsten Tag die Einbettung erfolgen konnte. Hierzu wurden die Embryonen in eine Blockschablone aus Silikonkautschuk (Fa. Plano) überführt und mit Durcupan bedeckt. Die Ausrichtung erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Pinzette. Die Aushärtung erfolgte im Ofen (Memmert) bei 56 °C über 3 volle Tage.

2.3.5 Histologische Techniken/Methoden

2.3.5.1 *in situ*--Hybridisierung

Die InSitu-Hybridisierung dient der Darstellung von mRNA in Gewebe und Zellen. Mit ihrer Hilfe kann Genexpression räumlich und zeitlich im vorher gut konservierten und dennoch permeablen Gewebe dargestellt werden, ohne dieses aus seinem morphologischen Zusammenhang zu entfernen. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft von Nucleinsäureketten, an komplementäre Nucleinsäureketten zu binden. Der Nachweis der hier untersuchten RNA-Moleküle erfolgt mit spezifischen RNA-Sonden über enzymatisch umgesetzte farbige Präzipitate. Die Sensitivität dieser Methode ist gering, die Spezifität dagegen sehr hoch.

Die Embryonen wurden in eine Mikrotiterplatte (2 ml, 24 Well, Corning, N.Y.) überführt. Eine Rehydrierung der in Methanol fixierten Embryonen erfolgte in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25% Methanol in DEPC-PBST) sowie reinem DEPC-PBST für

jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch (Duomax1030, Heidolph). Die darauf folgende Proteolyse wurde, ebenfalls bei Raumtemperatur, mit einer Proteinase-K-Lösung durchgeführt (20µg/ml), wobei pro Stadium der Hamburger-Hamilton-Nomenklatur eine Minute Verdauzeit gerechnet wurde. Zur Postfixierung wurden die Embryonen 20 Minuten in einer 0,2%igen Glutardialdehydlösung auf Eis inkubiert, dann für weitere 10 Minuten in DEPC-PBST, ebenfalls auf Eis. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden in auf 68 °C vorgewärmter Hybridisierungslösung im ebenfalls 68 °C warmen Wärmeschrank (Shake'n'Bake 136400, Boeckel). Nach Ablauf dieser zwei Stunden wurde die Lösung gewechselt und die Embryonen wurden über Nacht bei gleich bleibender Temperatur weiter inkubiert.

Zur Hybridisierung wurden die Embryonen mit den zu untersuchenden Sonden (1µl Digoxigenin-RNA-Sonde/ml Hybridisierungslösung) versehen und über Nacht bzw. über das Wochenende weiterhin bei 68 °C inkubiert.

Auch das Posthybridisierungswaschen erfolgte bei 68 °C für 2-mal 30 Minuten mit vorgewärmter Posthybridisierungslösung 1, gefolgt von weiterer Waschung bei gleichbleibender Temperatur für ebenfalls 2-mal 30 Minuten mit ebenfalls vorgewärmter Posthybridisierungslösung 2. Nun wurden die Embryonen 3-mal 10 Minuten in KBTB gewaschen und dann zur Vorbereitung der Antikörpermarkierung bei Raumtemperatur 4 Stunden in Lammserumlösung inkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte dann bei 4 °C über Nacht mit Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-Antikörper in Lammserumlösung 1:2000).

Am nächsten Tag wurde der Antikörper mit KBTB gründlich bei Raumtemperatur ausgewaschen (3-mal 10 Minuten, dann 6-mal eine Stunde) und die Waschung über Nacht bei 4 °C fortgesetzt.

Mittels Alkalische-Phosphatase-Puffer für 3-mal 10 Minuten wurden die Embryonen auf die Farbreaktion vorbereitet, dann erfolgte der Zusatz von BM-Purple mit 1 % 0,1 M Levamisol. Die nun ablaufende Färbung fand unter Lichtausschluss statt. Es wurden lediglich zur Kontrolle der Reaktion die Embryonen unter dem Stereomikroskop in regelmäßigen Abständen untersucht. Bei ausreichender Färbung wurde diese mit 1% Triton/PBS abgestoppt, 2-mal in PBS gewaschen und dann erfolgte eine Lagerung der Embryonen bis zur weiteren Bearbeitung bei 4 °C.

Die Darstellung im Schnitt erfolgte nach Einbettung in ein 5%iges Agarose-Medium.

Hierzu wurde eine 5% Agarose-Lösung hergestellt und von der noch flüssigen Lösung ein Boden in Glasförmchen gegossen. Die zu untersuchenden Embryonen wurden mittels Sieblöffel auf den gegossenen Boden überführt, mittels Pipettenspitze (1000µl, Eppendorf) ausgerichtet und mit weiterer Agarose begossen. Nach Abkühlen und damit verbundenem Aushärten konnten die Blöcke mittels Skalpellklinge zugetrimmt und mit einem Vibratom (Leica VT 1000 S) in PBS mittels einer Rasierklinge (Wilkinson) in 50 Mikrometer dicke Schnitte geteilt werden. Diese wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels in Serie auf Objektträger aufgezogen und nach Trocknung mit Aquatex (Merck) eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.3.5.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Darstellungen bedienen sich der Eigenschaft von Antikörpern, spezifisch an präsentierte antigene Strukturen in Geweben zu binden. Mit Hilfe von sekundären Antikörpern, die mit ihrem Fc-Fragment an den ersten Antikörper binden, also Anti-Antikörper sind, und an deren Fab-Fragmente Enzyme oder Farbstoffe gekoppelt sind, kann der primäre Antikörper und so dann auch seine spezifische Bindungsstelle detektiert werden.

Die in Paraffin eingebetteten und mittels Mikrotom (Reichert-Jung, Modell 2050) in 8 µm dicke Scheiben geschnittenen und mittels Wasserbad (GFL Burgwedel, Typ 1052) auf Objektträger (Thermo Superfrost, Menzel) gezogenen Embryonen wurden nach Trocknung (Wärmeplatte von Medax Nagel, 38 ° C, mind. 12 h) mit 4 Waschschritten Rotihistol und 2 Waschschritten 100% Ethanol (jeweils 3 Minuten) sowie einer absteigenden Ethanolreihe (95%, 90%, 80%, 70%; jeweils 2 Minuten) deparaffiniert und danach für 5 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Antigen-Demaskierung in kochender Citratpufferlösung im Dampfdrucktopf bei geschlossenem Deckel für 3-6 Minuten und ein vorsichtiges Abkühlen der Schnitte in der Lösung auf Raumtemperatur. Die so behandelten Schnitte wurden nun für mindestens 30 Minuten mit einer Lösung aus 5% Ziegen Serum in PBST bedeckt (jeweils 300 Mikroliter), um eine Blockierung von freiliegenden unspezifischen Bindungsstellen zu erreichen. Das Austrocknen wurde durch Schaffung einer feuchten Kammer und Bedecken der Schnitte mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI) verhindert. Nach der Blockierung wurde die genannte Lösung wieder entfernt, und die Schnitte wurden mit Antikörperlösung (5% Ziegen Serum/PBST plus Antikörper 1:600) bedeckt und über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte 3-mal 10 Minuten in PBS gewaschen, bevor die Detektionslösung mit dem zweiten Antikörper (1:300) aufgebracht wurde. Dieser verblieb mindestens 90 Minuten auf den Schnitten und die Reaktion fand, da die Antikörper fluoreszent markiert waren, im Dunkeln statt. Nach der nun folgenden dreifachen Waschung in PBS unter Lichtausschluss wurden die Schnitte mit DAPI/Fluoromount G (Southern Biotech) eingedeckelt und wegen der mit der Zeit verblassenden fluoreszenten Färbung zeitnah fotografiert.

2.3.5.3 Semidünnschnitte

Semidünnschnitte dienen der Darstellung des zu untersuchenden Gewebes in möglichst dünnen Lagen, die eine zelluläre Auflösung der Gewebemorphologie erlauben. Mit ihrer Hilfe kann die Gewebestruktur analysiert und auf Auffälligkeiten auf zellulärer Ebene untersucht werden.

Das ausgehärtete Kunstharz wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Rasierklinge trapezförmig auf die richtige Ebene zugetrimmt. Die Feinabstimmung erfolgte mittels eines Glasmessers (Plano) unter Aufsicht bereits an der Schneidemaschine (Reichert, Ultracut S). Schnitte wurden danach mittels eines Diamantmessers (Diatome, Drukker) in 0,5 µm Stärke angefertigt. Diese wurden mit einem Glasstäbchen auf Objektträger überführt und auf einer Wärmeplatte (Gerhardt) bei 68 °C getrocknet. Die Färbung der Schnitte erfolgte nach Hitzefixierung über einem Bunsenbrenner (Propan/Butan, Usbeck Typ 1420) und Erhitzung auf 100 °C. Aufgetragen wurden nun einige Tropfen Färbelösung (s.u.), ein Abwaschen der Lösung erfolgte nach 25 Sekunden mit Aqua bidest. Nach der anschließenden Trocknung konnten die Schnitte unter dem Mikroskop untersucht werden. Die Konservierung erfolgte mit Entellan (Merck) und Abdeckung durch ein Deckgläschen.

2.3.6 Fotografie

Die Aufnahme der Schnitte erfolgte mit einer Kamera (Zeiss Axio Cam) auf einem binokulären Mikroskop (Nikon) in Axio Vision im Durchlicht bzw. im Fall der Immunhistochemie unter Fluoreszenz (488 nm (*Pax2*) bzw. 400 nm (DAPI)).

Die Wholemound-Aufnahmen erfolgten mit einem Stereomikroskop (Leica MZ 16). Die Bearbeitung der Bilder erfolgte in Photoshop Elements und Gimp.

2.3.7 Operationsfeld und Struktur des Wolffschen Ganges

OP-Stadium	Somiten- anzahl	Länge des WG	Struktur des WG	OP-Bereich	Stück- zahl
HH 8	6 (4)	6.-8.Somit	Dünner Streifen	1+2 Somiten	n=1
HH 9	7 (7)	6.-8.Somit	strangförmig	1-2+3 Somiten	n=1
HH 9+	8	6.-11.Somit	spindelförmig	1+3 Somiten	n=1
HH 10 bis 10+	10 – 13 (10)	6.-12. Somit	strangförmig	1+3-4 Somiten	n=5
HH 11	10 – 15 (13)	6.-17. Somit	strangförmig	1+4-5 Somiten	n=4
HH 12	16 (16)	6.-19. Somit	strangförmig	1+3-4 Somiten	n=2
HH 12+	17 - 18	6.-19.(-22.) Somit Spitze 14.-19.(-22.) Somit	Strang teilt sich in dorsalen und ventralen Anteil	1+3-5 Somiten	n=2
HH 13	17 – 19 (19)	6.-22.(24.) Somit	Beginn der Lumen- bildung im dorsalen Anteil	1+3-5 Somiten	n=6
HH 14	22 (22)	6.-26.(27.) Somit	Kontinuierliches Lumen im dorsalen Anteil	1+4-5 Somiten	n=2

Erläuterungen:

- zwischen den einzelnen Stadien der HH -Nomenklatur gibt es Übergangsformen bzw. manche Embryonen sind nicht eindeutig zuzuordnen. So gibt hier die Somitenanzahl in Klammern die in der HH -Nomenklatur den einzelnen Stadien eindeutig zugeordnete Somitenzahl an, während die Anzahl ohne Klammern den Rahmen der eigenen Untersuchung umfasst
- die Länge des Wolffschen Ganges bezieht sich auf die in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse und deckt sich nicht zu 100% mit denen von Hiruma und Nakamura (2003)
- der OP-Bereich beschreibt die Strecke, über die die mesenchymale Spitze des Wolffschen Ganges entfernt wurde. Diese betrug in der Regel einen vollendeten sowie 2 bis 5 noch zu bildende Somiten

2.3.8 Embryonen zum Zeitpunkt der Untersuchung

Sonden	OP-Stadium	Somiten- anzahl bei OP	Entwicklungs- stadium bei US	Somiten- anzahl bei US	Bebrütungs- dauer	Embryonen -zahl (n)
c-Paraxis	HH 10 - 15+	12 – ca. 27	HH 15 - 18	27 - 38	69 – 81 h	n=3
c-Pax1	HH 8 - 14+	6 – ca. 23	HH 16 - 18	27 - 29	64,5 – 81 h	n=5
c-Pax2	HH 10 - 13	11 – ca. 18	HH 16 - 18	29 - 36	67 – 78,5 h	n=4
q-Pax3	HH 9 - 12+	8 – 18	HH 16 - 18	29 - 34	67 – 69 h	n=4
c-Pax9	HH 11- 13+	10 – ca. 21	HH 15 - 19	32 - 38	67,5 – 68, 5 h	n=4
c-MyoD	HH 11 - 14	15 - 22	HH 16 - 20	27 - 41	65 – 85,5 h	n=4

2.3.9 Puffer, Proteine und Chemikalien

20x SSC pH7,0	3mM NaCl 0,3M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat
Alkalische Phosphatase-Puffer	5M NaCl 1M MgCl ₂ 1M Tris pH 9,5 Triton X-100 10% ad 50 ml (Aq. bidest.)
Chaps	10 g Trockensubstanz ad 100 ml Aq. bidest.
Citratpuffer	15 ml Stammlösung A 100 ml Stammlösung B ad 1000 ml mit Aqua bidest.
Durcupan	8 ml Epoxyharz 12 ml single component 0,3 ml Beschleuniger 960 0,1 ml Weichmacher
Färbelösung Semidünnschnitte	1g Azur II 1g Methylenblau 1g Na-Tetraborat ad 100 ml Aq. Dest.
Färbestifte:	170mg Agarose 10 ml H ₂ O 100 mg Nilblau
Glutardialdehyd-Lösung	PfA 4% ; Glutardialdehyd 25%
Hybridisierungslösung	10mM Tris pH 7,5 600mM NaCl 1mM EDTA

	0,25% SDS 10% Dextransulfat 1x Denhardt's 200 µg/mL Hefe-tRNA 50% Formamid
KTBT	50 mM Tris-Hel 150 mM NaCl 10mM KCl 1% Triton X-100
Lammserumlösung(20%)	KTBT Lammserum
Locke-Lösung	161mM NaCl 6mM KCl 2mM CaCl ₂ 0,05-0,1 mM PenicillinG
Osmium 350mOsmol, pH 7,4	1% Kaliumbichromat 1% Osmiumtetraxyd 0,85% NaCl
PBS pH 7,4	8mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄ 137mM NaCl 2,7mM KCl
PBST	PBS + 0,1 % Triton
Posthybridisierungslösung 1(SSC2%, Chaps0,1%)	20x SSC Chaps 10% DEPC-H ₂ O
Posthybridisierungslösung 2(SSC0,2%, Chaps0,1%)	20x SSC Chaps 10% DEPC-H ₂ O
Proteinase K-Lsg.	20 mg Proteinase K 1 ml PBT
StammlösungA	21,1 g Citronensäuremonohydrat ad 1000 ml Aqua dest.
StammlösungB	29,41 g Natriumcitratdihydrat ad 1000 ml Aqua dest.
Serra-Lösung	70ml EtOH 100% 30ml Formaldehyd 37% 10ml Eisessig
Tris-Puffer	121,1 g Tris 1000 ml Aq. bidest. Einstellung auf pH mit HCl

2.3.10 Primäre Antikörper

Name	Hersteller/Vertrieb	Quelle/Tierart	Verdünnung	Katalognummer
Pax2	Covance	Kaninchen	1 zu 600	PRB-276P
Anti-Digoxigenin	Roche Diagnostics		1 zu 2000	11093274910

2.3.11 Sekundäre Antikörper

Name	Hersteller/Vertrieb	Quelle/Tierart	Verdünnung	Katalognummer
GAR Alexa 488 (H+L)	Invitrogen	Ziege	1 zu 3000	A11008

2.3.12 Enzyme

Name	Hersteller/Vertrieb	Katalognummer
Proteinase K	Sigma	3115836001

2.3.13 Sonden/Plasmide

Name	Herkunft
<i>c-MyoD</i>	Bruce Paterson, Bethesda, CA
<i>c-Paraxis</i>	Eric Olson, Dallas, TX
<i>c-Pax1</i>	1,5 kb insert cloned into pBluescriptII KS, Ebensperger et al.(1995)
<i>c-Pax2</i>	Doris Herzlinger, NY
<i>c-Pax9</i>	1,1 kb full length, Müller et al., 1996
<i>q-Pax3</i>	1543 bp insert cloned into pGEM72F, Marianne Bonner-Fraser, Pasadena, CA

2.3.14 Andere Chemikalien

Name	Hersteller/Vertrieb
Rotihistol	Roth
Ethanol	Riedel De Haen
Methanol	Riedel De Haen
Paraffin	Roth
BM-Purple	Roche Diagnostics
Paraformaldehyd	Sigma
Microscopy Aquatex	Merck
DAPI/Fluoromount	Southern Biotech
Agarose	Sigma

Nilblau	Merck
Osmiumtetraxyd	Plano
Propylenoxid	Serva Elektrophoresis, Heidelberg
Durcopan	Fluka Chemie, Schweiz
Glutaraldehyd	Sigma
DEPC	Sigma
Triton X-100	Sigma

3 Ergebnisse

Die im Folgenden beschriebenen Schnitte wurden nach den im Abschnitt „Material und Methoden“ beschriebenen Verfahren angefertigt und werden in kranio-kaudaler Abfolge beschrieben. Untersuchungsgegenstand war, wie schon erwähnt, das Rumpfsegment zwischen den beiden Extremitätenpaaren.

3.1 Ergebnisse Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte wurden zur Darstellung von Gewebsstruktur und Zelldichte angefertigt, um auf dieser Ebene sowohl den Erfolg der Operation als auch deren unmittelbare Auswirkungen auf die Somitenderivate und andere umgebende Gewebe aufzeigen zu können.

Bei der Betrachtung der Semidünnschnitte fällt in Abbildung 3.1 eine weitgehende Symmetrie der beiden Hälften des Embryos auf, wobei Chorda und Neuralrohr die Spiegelachse bilden. Das epitheliale Dermomyotom liegt hoch dorsal unter einer geschlossenen ektodermalen Decke und hat bereits seine dorsomediale und ventrolaterale Lippe ausgebildet. Im Bereich des ventromedial davon gelegenen Sklerotom sieht man den deutlich lockereren mesenchymalen Zellzusammenhang, der im perichordalen Raum noch einmal an Zelldichte verliert. Die beiderseits ventrolateral des Sklerotoms gelegene endothelial ausgekleidete Aorta ist noch nicht fusioniert, Chorda und Neuralrohr haben auf beiden Seiten eine einheitliche Form. Deutlich sieht man auf der Kontrollseite, der linken Seite des Embryo die Struktur des Wolffschen Ganges, der sich lateral des Sklerotoms und ventrolateral der ebenfalls endothelial begrenzten Kardinalvene liegend, als Hohlorgan mit hochprismatischem Epithel und randständigen Zellkernen darstellt. Auf der rechten Seite fehlt diese Struktur. Der Bereich ist vollständig mit nephrogenem Mesenchym ausgefüllt.

Einzige Auffälligkeit im Seitenvergleich ist das auf der operierten Seite deutlich größer erscheinende Lumen der posterioren Kardinalvene und der ventral davon gelegene, etwas ungeordneter und dichter erscheinende Bereich des nephrogenen Mesenchyms. Dessen Zellen weisen auf der kontralateralen Seite bei intakter Struktur des Wolffschen Ganges eine eher ventromedial-dorsolaterale Ausrichtung auf.

Im nächsten Schnitt, der Abbildung 3.2, liegt ebenso eine fast vollständig symmetrische Ausbildung der beiden Seiten des Embryos vor. Die Zelldichte im Sklerotom ist ebenfalls auf beiden Seiten gleich. Zu bemerken ist allerdings hier die ungeordnete, größer erscheinende

Auf den Abbildungen 3.1 und 3.2 sind zwei Semidünnschnitte in horizontaler Ebene durch einen HH 15-Embryo im Bereich des kranialen und im Übergang zum mittleren Rumpf dargestellt (OP-Stadium HH 11+). Pfeil: Struktur des Wolffschen Ganges; C: Chorda dorsalis; N: Neuralrohr; D: Dermomyotom; S: Sklerotom; Lichtmikroskop, Vergrößerung 40-fach



Abbildung 3.1: Semidünnschnitt im kranialen Rumpf.

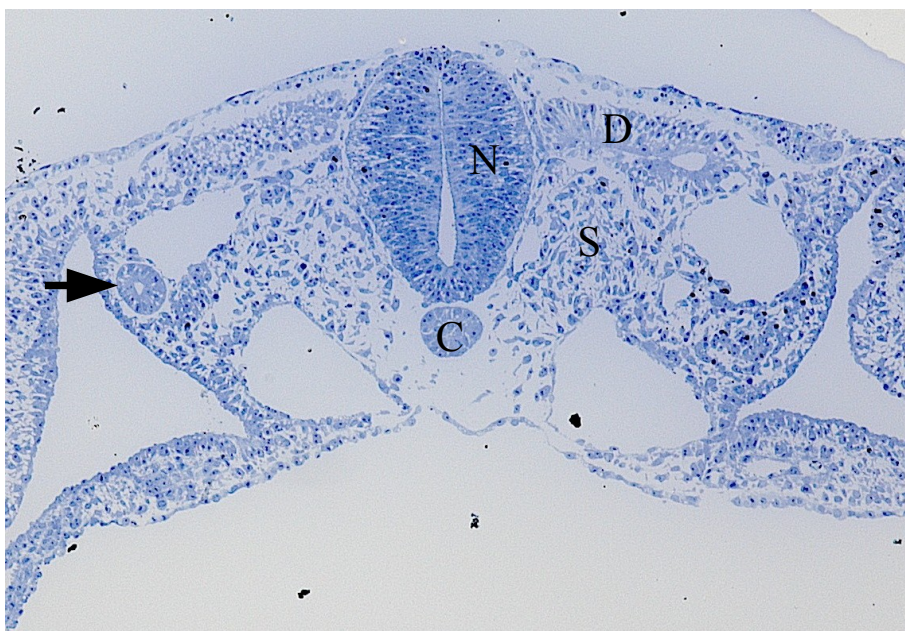


Abbildung 3.2: Semidünnschnitt im Übergang zum mittleren Rumpf

Struktur des nephrogenen Mesenchyms sowie der schmalere Übergang zum Seitenplattenmesoderm. Die rechte Vene ist nur wenig größer.

Zusammenfassung

Fasst man die durch histologische Darstellung gewonnenen Ergebnisse zusammen, sind keine Veränderungen der Somitenmorphologie durch die Entfernung des Wolffschen Ganges festzustellen. Auffällig sind im intermediären Mesoderm die veränderte Organisation der Zellen der Region des nephrogenen Mesenchyms sowie das im kranialen Bereich deutlich stärkere Lumen der Vene auf der operierten Seite.

3.2 Ergebnisse Immunhistochemie

Ziel der Antikörperfärbung auf Paraffinschnitten war die Darstellung der Expression von *Pax2* auf Proteinebene im Vergleich zwischen der intakten Hälfte des Embryos und der operierten Seite. Zudem sollte untersucht werden, ob eine vom Wolffschen Gang unabhängige *Pax2*-Expression im nephrogenen Mesenchym vorhanden ist. Zur besseren Kenntlichmachung der Zellen wird im Bildmaterial nach der immunhistochemischen Färbung der gleiche Schnitt mit Kernfärbung dargestellt.

In den immunhistochemisch behandelten und fluoreszent gefärbten Paraffinschnitten zeigt sich eine auf den Bereich der Nierenanlage beschränkte Expression von *Pax2*. Deutlich zu sehen ist dieses in den Abbildungen 3.3 und 3.4 im Bereich der randständig liegenden Zellkerne des hochprismatischen Epithels des Wolffschen Ganges und in den medial davon gelegenen Zellen des nephrogenen Mesenchyms, auch hier am deutlichsten im Bereich der Zellkerne. Signifikant ist das deutlich stärkere Signal auf der nicht operierten, linken Seite, während auf der rechten nur eine schwache, aber nachweisbare Expression im nephrogenen Mesenchym vorhanden ist.

Ebenfalls bemerkenswert ist die Abnahme der Signalstärke auf der nicht operierten Seite zur Peripherie hin. So sind ausgehend von einem Zentrum mit starker Expression, das wenig kleiner ist als der Durchmesser des Wolffschen Ganges noch einige wenige markierte Zellen in medioventraler Richtung auszumachen.

Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen ein ähnliches Expressionsmuster, auffällig ist im Vergleich zur vorangegangenen Abbildung die deutlich breitere Streuung der Expression auf der intakten, nicht operierten Seite, die nun nicht mehr auf einen kleinen Bereich medial des Wolffschen Ganges beschränkt ist, sondern sich, von diesem mit breiter Basis ausgehend,

Zwei immunfluoreszent markierte Darstellungen desselben Horizontalschnittes im kranialen Rumpf eines HH 18-Embryos. OP-Stadium: HH 10. Verwendeter Antikörper: Pax2; Pfeil: Wolffscher Gang; Stern: nephrogenes Mesenchym. Fluoreszenzmikroskop, 488 nm (Pax2) bzw. 400 nm (DAPI); Vergrößerung 40-fach

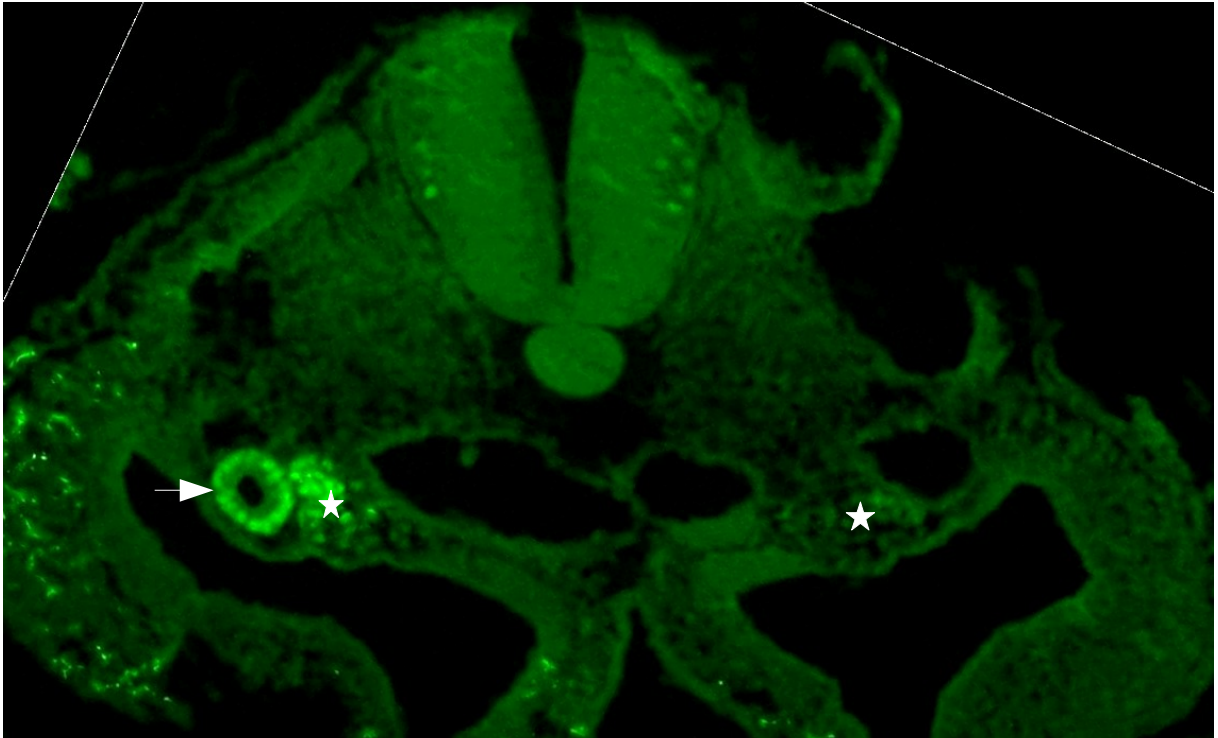


Abbildung 3.3: Pax2

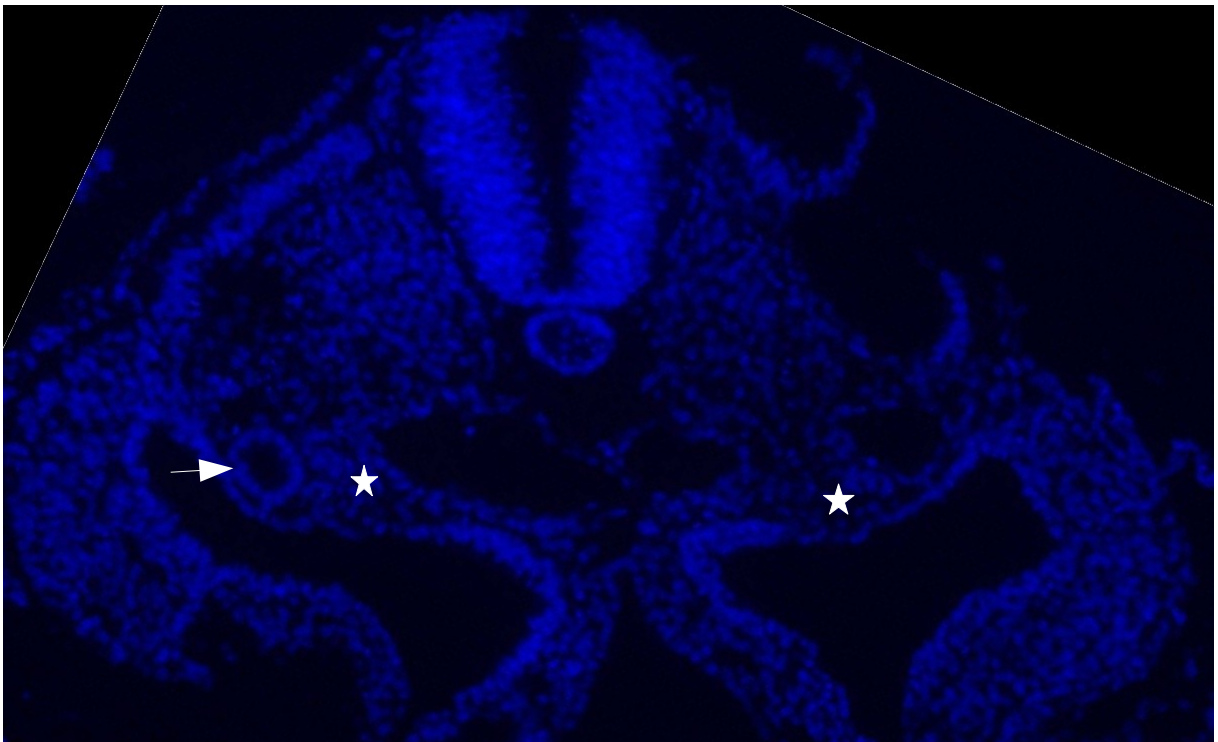


Abbildung 3.4: DAPI

Zwei immunfluoreszent markierte Darstellung desselben Horizontalschnittes im Übergang zum kaudalen Rumpf eines HH 18-Embryos. OP-Stadium: HH 10. Verwendeter Antikörper: Pax2; Pfeil: Wolffscher Gang; Stern: nephrogenes Mesenchym. Fluoreszenzmikroskop, 488 nm (grün) bzw. 400 nm (blau); Vergrößerung 40-fach

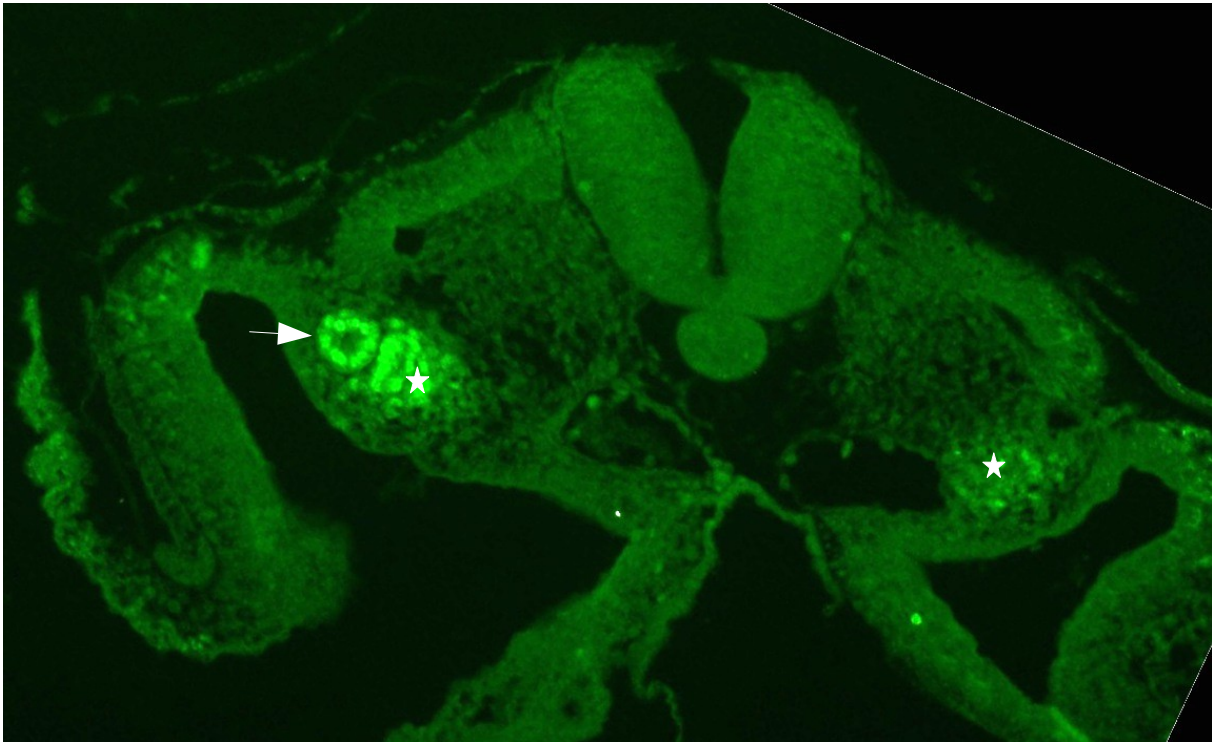


Abbildung 3.5: Pax2

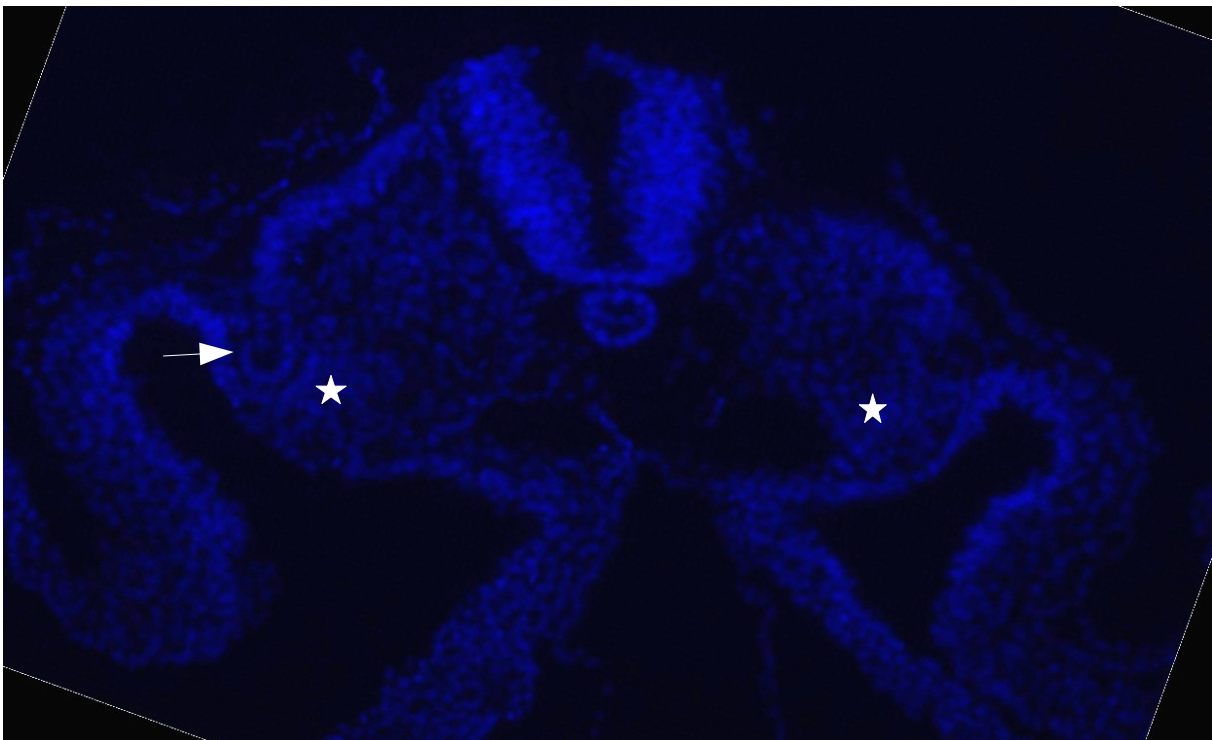


Abbildung 3.6: DAPI

nach ventromedial verjüngt. Auch die Signaldichte im Bereich medial des Wolffschen Ganges hat nachgelassen und ist jetzt nahezu gleichförmig verteilt über die gesamte Fläche, die sich im Durchschnitt ungefähr verdoppelt hat. Unverändert ist hingegen die Expression in den Zellen des Wolffschen Ganges. Auf der operierten Seite ist nun ein etwas stärkeres, jedoch im Vergleich zur intakten Seite noch immer sehr schwaches Signal auszumachen, das aber nach medioventral ebenfalls über eine deutlich größere Fläche ausgedehnt ist. Zu bemerken ist auch, dass auf der intakten Seite zwischen den *Pax2*-positiven Zellen und der Aorta sklerotomale Struktur erhalten ist, während auf der operierten Seite die signalgebenden Zellen unmittelbar lateral der Aorta liegen.

Zusammenfassung

Abschließend betrachtet ist hier die zwar bedeutend schwächere, aber dennoch deutlich vorhandene *Pax2*-Expression im intermediären Mesoderm bei Entfernung der Spitze des Wolffschen Ganges zu bemerken, was eine zumindest teilweise autarke Entwicklung des nephrogenen Mesenchyms vermuten lässt. Auf beiden Seiten schreitet die Expressionsstärke nach kaudal fort und dehnt sich zudem über einen größer werdenden Bereich aus. Während auf der intakten Seite eine deutliche sklerotomale Barriere das intermediäre Mesoderm auch in der kaudalen Region von der Struktur der Aorta trennt, nähert sich auf der operierten Seite Gewebe mit *Pax2*-Expression eben dieser an.

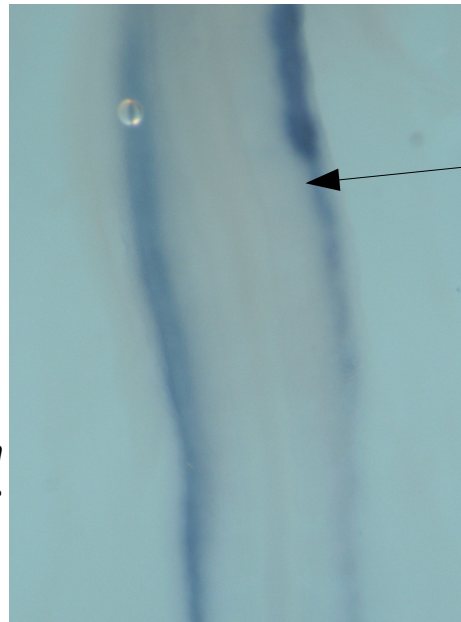
3.3 Ergebnisse in situ-Hybridisierung

3.3.1 Wholemountdarstellung *Pax2*

Diese Wholemountabbildung ist eine Darstellung eines Teils des Thorakolumbalsegments eines HH 16+-Embryos im Auflicht. Die Ausrichtung ist kranio-kaudal, der kraniale Anteil weist nach oben. Ziel dieser Aufnahme war herauszufinden, ob im Wholemount ein ersichtlicher Unterschied in der *Pax2*-Genexpression auf mRNA-Ebene nach einseitiger operativer Entfernung des Wolffschen Ganges vorliegt.

Abbildung 3.7 zeigt das Expressionsmuster von *Pax2*, einem in diesem Bereich auf das intermediäre Mesoderm beschränkten Transkriptionsfaktor. Deutlich zu sehen ist die auf der intakten Seite kontinuierliche und gleichmäßige Expression im intermediären Mesoderm, während auf der operierten Seite einige Unterschiede zu bemerken sind. Hier fällt die auf den Bereich kranial der Exstirpationsstelle des Wolffschen Ganges begrenzte stärkere Expression auf. Kaudal davon zeigt sich eine deutlich schwächere *Pax2*-Expression im intermediären Mesoderm, die nach kaudal zudem zunehmend schwächer wird. Aus den in Abschnitt 3.2

Abbildung 3.7: Wholemountdarstellung des Rumpfes eines HH 16+-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Pax2; Pfeil: Ablationsstelle



gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass diese schwächere Expressionsdomäne dem kaudal der Exstirpationsstelle persistierenden, *Pax2*-positiven nephrogenen Mesenchym entspricht.

3.3.2 Schnittdarstellung *Pax2*

Die Studie mit dem Transkriptionsfaktor *Pax2* dient einerseits dem Nachweis von *Pax2* auf mRNA-Ebene, andererseits können bei Hinzuziehung der immunhistologischen Darstellungen zum Vergleich die Expressionsmuster auf mRNA- und Proteinebene direkt miteinander verglichen werden. *Pax2* ist ein Marker des intermediären Mesoderm. Die Schnittebenen liegen in kaudo-kranialer Abfolge zwischen den Extremitätenpaaren, untersucht wurden n=4 Embryonen.

Wenig kranial der Hinterextremitätenanlage ist in Abb. 3.8 der Querschnitt der in dieser Serie jüngsten Somiten zu sehen. Ihre Form ist annähernd rund, zeigt aber auch zum intermediären Mesoderm hin Auflösungserscheinungen bzw. EMT. Sie sind bilateral symmetrisch, wobei die Chorda und das Neuralrohr als Spiegelachse fungieren. Auf beiden Seiten zeigt sich sowohl in den Somiten und der Chorda als auch im intermediären Mesoderm eine schwache *Pax2*-Expression, wobei die in der Chorda ein Färbungsartefakt darstellt. Eine starke Expression ist auf die Struktur des Wolffschen Ganges beschränkt. Weitere Auffälligkeiten im Seitenvergleich gibt es nicht.

Die nächste Schnittebene, Abb. 3.9, zeigt ein fast kreisrundes Somitenpaar mit nach lateral, zum intermediären Mesoderm hin, gerichteten Auflösungserscheinungen der epithelialen Struktur. Eine starke *Pax2*-Expression ist hier nur in der Struktur des Wolffschen Ganges

wahrzunehmen, das nephrogene Mesenchym bzw. intermediäre Mesoderm zeigt auf beiden Seiten nur ein schwaches Signal.

Abbildung 3.10 zeigt ein deutlich älteres Somitenpaar, dessen epitheliale Randstruktur fast noch geschlossen ist, sich allerdings im ventrolateralen Bereich bereits aufgelöst hat. Deutlich ist auch in dieser Ebene die Achsensymmetrie der Somiten, deren Form nun einem nach lateral gewölbten Halbkreis gleicht. Der nahe unter dem Ektoderm liegende Wolffsche Gang auf der linken Seite weist auch in diesem Schnitt wieder die stärkste Expression auf, die wie bei allen Schnitten im Bereich des Lumen am deutlichsten wahrzunehmen ist. Die Expression im nephrogenen Mesenchym ist in der Stärke auf der intakten Seite deutlicher als in der vorangegangenen Aufnahme. Auf der operierten Seite dehnt sich in diesem Schnitt die *Pax2*-Expression über das ganze intermediäre Mesoderm aus und ist im Seitenvergleich deutlich schwächer als auf der intakten Seite.

In Abbildung 3.11 geht die Form der Somiten von der Halbkreis- zur Keilform über. Die epitheliale Struktur des sich bildenden Dermomyotoms setzt sich bilateral symmetrisch entlang des Neuralrohres nach ventral fort.

Auf der operierten Seite füllt eine sehr schwache, aber durchaus vorhandene *Pax2*-Expression den Bereich des gesamten intermediären Mesoderms aus, während auf der intakten Seite eine deutlich stärkere Expression ventromedial des Wolffschen Ganges festzustellen ist. Die stärkste Expression findet sich auch hier im Wolffschen Gang. Die Expression im nephrogenen Mesenchym ist nach medioventral gerichtet und nimmt zur Peripherie hin ab, während sie auf der operierten Seite eher gleichmäßig diffus verteilt ist.

Die nächste Abbildung, 3.12 zeigt etwas ältere, keilförmige Somiten mit deutlich schmalerer dermatomyotomaler Struktur, die im Seitenvergleich vollkommen symmetrisch erscheinen. Auch hier fällt die starke *Pax2*-Expression im Bereich des Wolffschen Ganges auf der intakten Seite auf, das Signal im nephrogenen Mesenchym entspricht der Stärke in den Zellen des Wolffschen Ganges und erstreckt sich medioventral dieser Struktur. Auf der operierten Seite zeigt sich die Expression deutlich schwächer und diffuser und füllt nahezu den gesamten Bereich des intermediären Mesoderms aus.

Abbildung 3.13 zeigt einen Schnitt wenig kaudal der Flügelknospen. Die *Pax2*-Expression ist auf der intakten, linken Seite am Stärksten luminal im Wolffschen Gang auszumachen, aber auch im medioventral davon gelegenen nephrogenen Mesenchym ist eine deutliche Expression zu sehen, die etwa ein 1,5-faches der Fläche des Wolffschen Ganges einnimmt.

Horizontalschnitte durch den Rumpf eines HH **16+**-Embryos nach *in situ*-Hybridisierung mit **c-Pax2**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

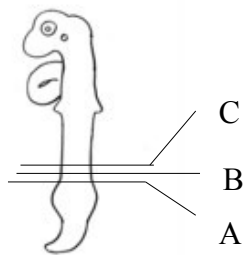


Abbildung 3.8:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene A; Pfeil:
Wolffscher Gang

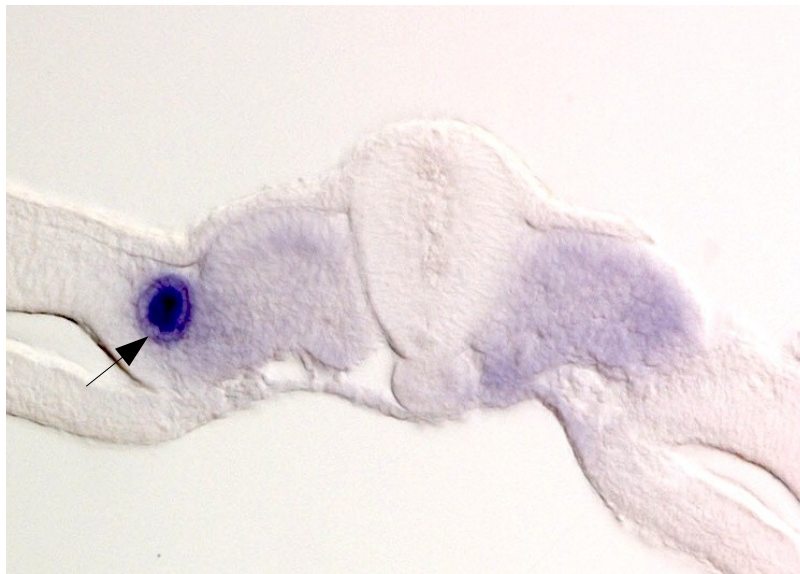


Abbildung 3.9:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene B; Pfeil:
Wolffscher Gang

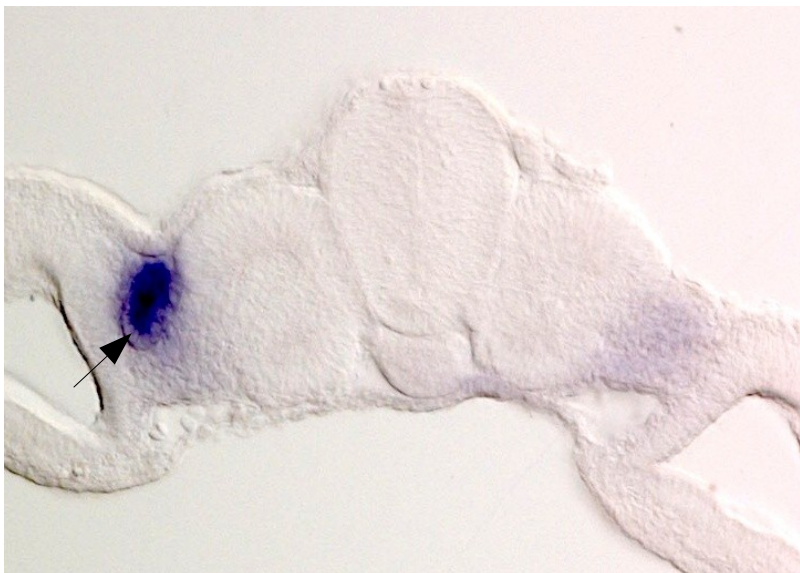
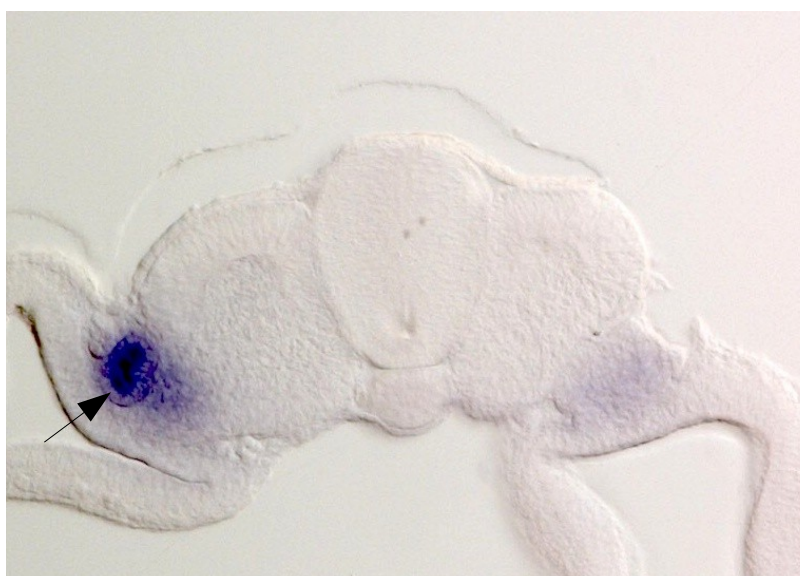


Abbildung 3.10:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene C; Pfeil:
Wolffscher Gang



Horizontalschnitte durch den Rumpf eines HH **16+**-Embryos nach in situ- Hybridisierung mit **c-Pax2**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

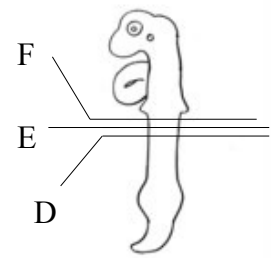
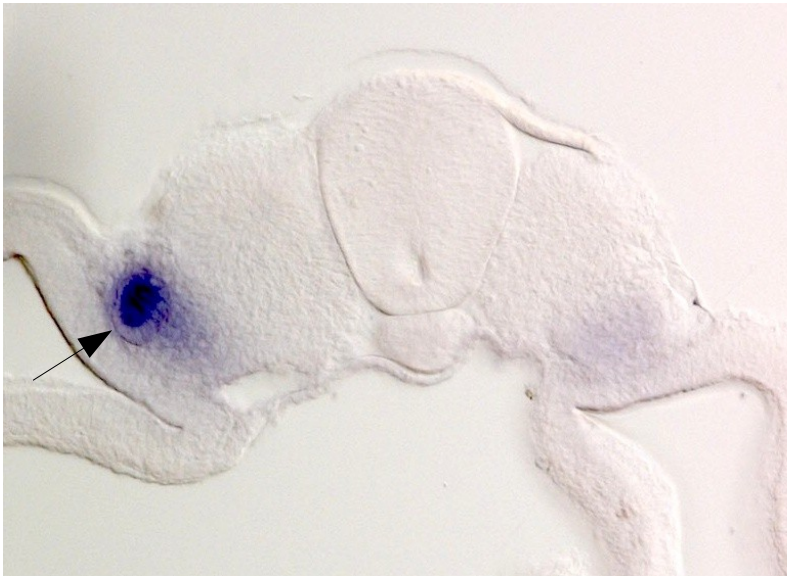


Abbildung 3.11:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines HH 16+-
Embryos; **Schnittebene D**;
Pfeil: Wolffscher Gang



Abbildung 3.12:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene E; Pfeil:
Wolffscher Gang



Abbildung 3.13:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene F; Pfeil:
Wolffscher Gang

Auf der operierten, rechten Seite fehlt die Struktur des Wolffschen Ganges, aber auch hier ist eine deutliche Expression im nephrogenen intermediären Mesoderm wahrzunehmen, wenn auch etwas lokalisierter und schwächer. Sonstige Unterschiede bestehen im Seitenvergleich nicht; der Somit ist beiderseits in etwa dreieckig, das Dermomyotom schmal.

Zusammenfassung

Abschließend ist hier festzustellen, dass eine starke *Pax2*-Expression im Wolffschen Gang vorliegt und auch im gesamten untersuchten Abschnitt gleich zu sein scheint. Im medioventral davon gelegenen nephrogenen Mesenchym ist eine schwächere, aber ebenfalls deutliche Expression wahrzunehmen, die von kranial nach kaudal abnimmt. Wird die Spitze des Wolffschen Ganges entfernt und der Gang so am Auswachsen gehindert, ist im intermediären Mesoderm der operierten Seite trotzdem eine, wenn auch deutlich schwächere, *Pax2*-Expression vorhanden, die kranial im Bereich des nephrogenen Mesenchyms lokalisiert ist, sich nach kaudal zunehmend diffus über das gesamte intermediäre Mesoderm verteilt, in der Intensität aber schwächer wird.

3.3.3 Wholemountdarstellungen der untersuchten Transkriptionsfaktoren

Die Wholemountdarstellungen zeigen, wie auch schon bei *Pax2*, einen Teil des Thorakolumbalsegments im Auflicht. Die Ausrichtung ist ebenfalls kranio-kaudal, mit dem kranialen Anteil nach oben. Ziel dieser Aufnahmen war die Untersuchung auf im Wholemound ersichtliche Unterschiede in der somitischen Genexpression auf mRNA-Ebene nach einseitiger operativer Entfernung des Wolffschen Ganges.

Abbildung 3.14 zeigt das Expressionsmuster von *MyoD* in der Aufsicht. *MyoD* wird zu diesem Zeitpunkt in diesem Abschnitt in myotomalen Zellen exprimiert.

Zentral in der Längsachse des Bildes liegt als erkennbare Struktur das Neuralrohr, an das sich zu beiden Seiten die Somiten anschließen. Diese sind in der Aufsicht annähernd rechteckig. Das Expressionsmuster von *MyoD* ist auf beiden Seiten des Embryos gleich und repräsentiert das unter dem Dermomyotom gelegene Myotom.

Die Expression des Epithelisierungsfaktors *Paraxis* in Abbildung 3.15 ist ebenfalls bilateral-symmetrisch und entspricht dem Dermomyotom. Auch in dieser Aufnahme haben die Somiten in der Aufsicht eine quadratische bis rechteckige Form. Auffällig ist hier eine Verstärkung des Signals im apikalen Teil der epithelialen Zellen, also in Richtung des Somitozöls.

Auch in Abbildung 3.16 sehen wir eine bilateral-symmetrische Expression. Als Sonde diente hier *Pax1*, ein Marker des medialen Sklerotoms. Die sklerotomale Expression erscheint etwas diffus aufgrund der tiefen Lage des Sklerotoms ventral des Dermomyotoms. Auffälligkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Seiten des Embryos sind nicht zu bemerken.

Die in Abb. 3.17 gezeigte Expression von *Pax3*, einem Marker des Dermomyotoms, ist hingegen wieder von Symmetrie geprägt. Auf beiden Seiten des Neuralrohres, das im kranialen Teil dieses Segments noch nicht ganz geschlossen ist, lassen sich die quadratisch bis rechteckigen Dermomyotome erkennen. Die stärkste *Pax3*-Expression tritt am lateralen Rand auf und markiert dort die ventrolaterale dermatomyotomale Lippe.

Bei der Betrachtung von Abb. 3.18, die das Expressionsmuster von *Pax9*, einem Marker des lateralen Sklerotom darstellt, sind ebenfalls keinerlei Auffälligkeiten zu bemerken. Die Expression ist gleichmäßig über die Sklerotome beider Körperhälften verteilt.

Zusammenfassung

Festzuhalten ist, dass die Entfernung des Wolffschen Ganges auf die Expression der verschiedenen Transkriptionsfaktoren der Somitenentwicklung, soweit in der Aufsicht beurteilbar, keinen direkten Einfluss nimmt.

Die Abbildungen 3.14 bis 3.18 zeigen die Wholemountdarstellungen der operierten Embryonen nach in situ- Hybridisierung mit unterschiedlichen Sonden; Lichtmikroskop, Vergrößerung 12-fach

Abbildung 3.14: Wholemountdarstellung des Rumpfes eines HH 19-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-MyoD

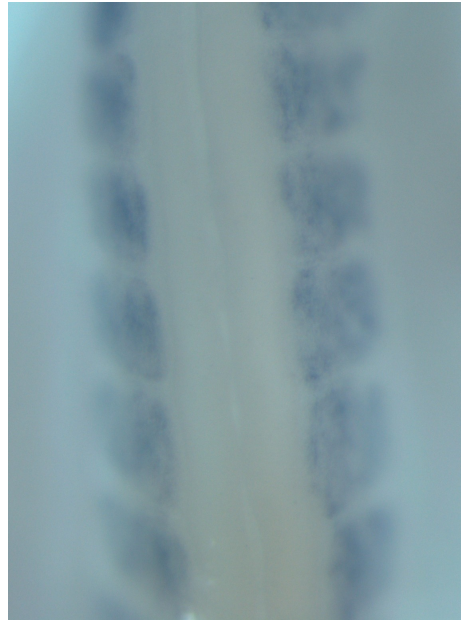
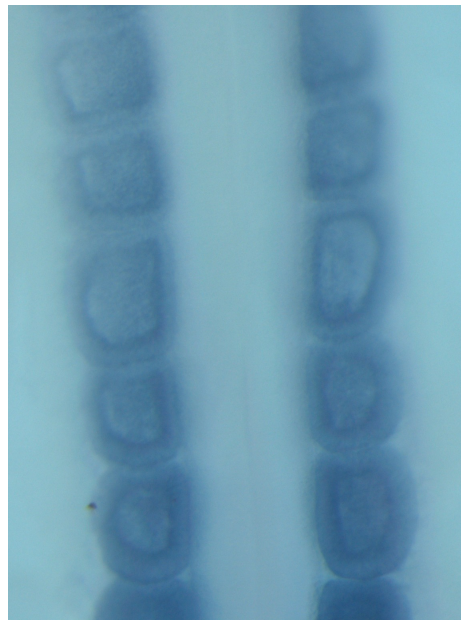


Abbildung 3.15: Wholemountdarstellung des Rumpfes eines HH 18-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Paraxis



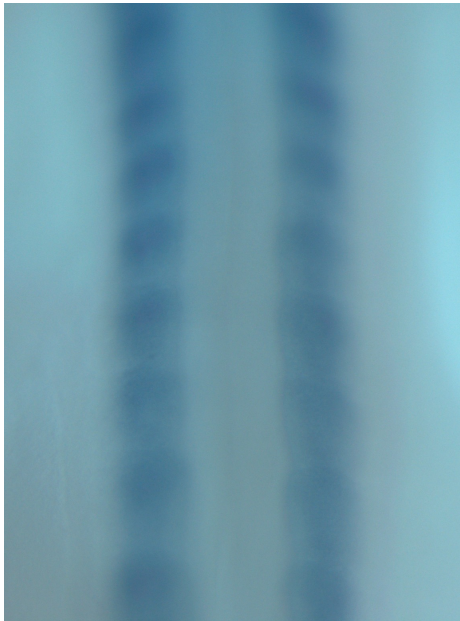


Abbildung 3.16: Wholemountdarstellung des Rumpfes eines HH 18-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Pax1

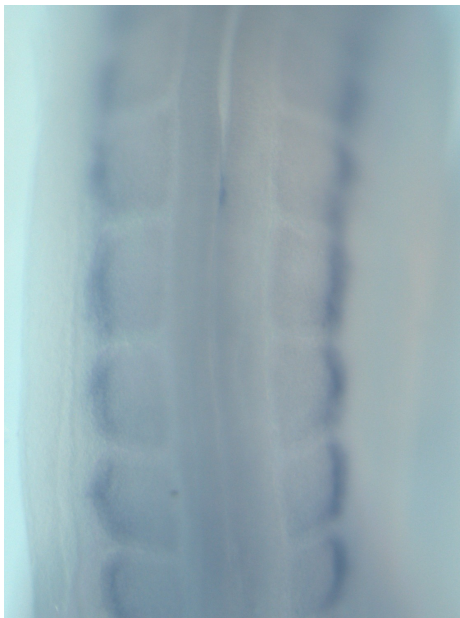


Abbildung 3.17: Wholemountdarstellung des Rumpfes eines HH 16+-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit q-Pax3

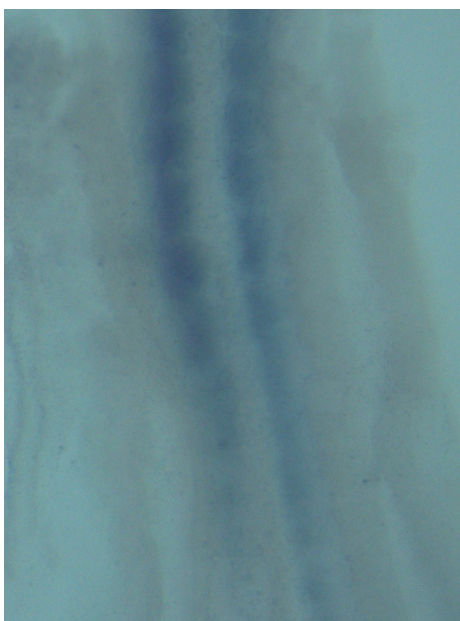


Abbildung 3.18: Wholemountdarstellung des Rumpfes eines HH 15+-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Pax9

3.3.4 Schnittdarstellungen

Die dargestellten Schnitte wurden im Bereich des Thorakolumbalsegmentes aus *in situ*-hybridisierten Wholemout-Embryonen angefertigt. Die Schnittebene steht transversal zur Körperlängsachse der Embryonen. Sie dienen wie die Wholemout-Bilder der Darstellung der Genexpression auf mRNA-Ebene, verfeinern aber deren Aussage durch spezifischere Darstellung der einzelnen embryonalen Strukturen und eindeutigere Lokalisation der Expressionsmuster der einzelnen Gene. Wie schon bei den Semidünnschnittbildern dienen auch hier Neuralrohr und Chorda als Spiegelebene der beiden Seiten des Embryos. Die Schnitte werden in Serien von kaudal nach kranial gezeigt, wobei die erste Abbildung den am weitesten kaudal, wenig kranial der Hinterextremitätenanlage angefertigten Schnitt zeigt, während das letzte Bild eine Ansicht des kurz hinter der Vorderextremitätenanlage geschnittenen Embryos darstellt.

3.3.4.1 *Paraxis*

Der in den Abbildungen 3.19 bis 3.24 dargestellte Transkriptionsfaktor ist *Paraxis*. Es wurden insgesamt n=3 Embryonen untersucht. Die Schnittebene von Abb. 3.19 liegt wenig kranial der Hinterextremitätenanlage.

Die Somiten sind hier noch nahezu kugelförmig und in der Entwicklung relativ jung. Der Wolffsche Gang liegt auf der intakten Seite fast direkt unter dem Ektoderm. Das Expressionsmuster von *Paraxis* tritt bei diesen Somiten fast im gesamten epithelialen Somiten auf, denn auch nach medial zum Neuralrohr hin zeigt sich eine feine, aber nicht ganz durchgängige Linie. In dieser Abbildung ist die Expression am ventralen Rand des Somiten genauso stark wie im zukünftigen Dermomyotom. Die Somitozöllen zeigen hier nur eine schwache Expression. Auffällig ist bei dieser Aufnahme die zum intermediären Mesoderm hin schwächer werdende Signalstärke. Sie ist auf der operierten Seite auch in Abwesenheit des Wolffschen Ganges zu beobachten.

Die Somiten in Abb 3.20 sind etwas älter als die vorangegangenen, die Schnittebene liegt weiter kranial. Die Somiten haben hier im Querschnitt ungefähr Keilform. Der Wolffsche Gang liegt lateral der Somiten im intermediären Mesoderm. Die stärkste *Paraxis*-Expression ist hier im sich bildenden Dermomyotom zu bemerken, aber auch im entstehenden ventralen Sklerotom ist eine starke Expression auszumachen. Ein nur schwaches Signal ist in diesem Schnitt im Somitozöl sowie am Übergang zum intermediären Mesoderm zu erkennen, wieder gleichermaßen auf der Operierten und der Kontrollseite.

Noch weiter kranial, in Abb. 3.21 präsentiert sich ein noch älterer Somite. Hier ist die Form der Somiten beiderseits ungefähr halbkreisförmig mit der konvexen Seite nach ventro-lateral. Die stärkste *Paraxis*-Expression ist auch hier im Bereich des sich gerade bildenden Dermomyotoms zu sehen. Dieses ist noch nicht scharf abgegrenzt. Die in den vorherigen Abbildungen wahrgenommene Expression von *Paraxis* im ventralen Bereich des Somiten ist hier deutlich schwächer, im Übergang zum intermediären Mesoderm ist die Intensität der Expression nochmals deutlich reduziert. Unterschiede im Seitenvergleich bestehen, bis auf die nur links vorhandene Struktur des Wolffschen Ganges, die sich hier nach ventral verlagert, nicht.

In Abbildung 3.22 ist die Somitenreifung weiter fortgeschritten. Die Somiten sind im Querschnitt halbkreisförmig. Auch hier dominieren im Seitenvergleich die Gemeinsamkeiten, einziger Unterschied ist wiederum das Fehlen der Struktur des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite. In dieser Aufnahme ist nun die starke Expression von *Paraxis* in der Hauptsache auf das Dermomyotom begrenzt, im ventralen Somiten zeigt sich nur mehr eine sehr schwache Expression.

Abbildung 3.23, etwas weiter kranial geschnitten, zeigt ein ähnliches Bild. Der Somite hat nun nahezu Keilform, die Expression von *Paraxis* ist auf den Bereich des Dermomyotoms beschränkt. Auch hier fehlt rechts der Wolffsche Gang. Das Expressionsmuster von *Paraxis* ist jedoch auf beiden Seiten gleich.

Auch in Abb. 3.24 fehlt auf der rechten, operierten Seite die ringförmige Struktur des Wolffschen Ganges unter der lateroventral des Somiten gelegenen Kardinalvene. Die Expression von *Paraxis* ist beiderseits auf den Bereich des Dermomyotoms beschränkt. Sowohl in Verteilung als auch Stärke besteht kein Unterschied in den Expressionsmustern auf operierter und Kontrollseite. Der Somite hat hier insgesamt eine nahezu dreieckige Form und hat mit der dorsoventralen Kompartimentalisierung und der EMT des Sklerotoms bereits abgeschlossen.

Zusammenfassung

Zusammenfassend ist hier also zu bemerken, dass das Expressionsmuster von *Paraxis* auch noch nach Entfernung des Wolffschen Ganges auf beiden Seiten gleich ist. Es ist auf epitheliale Bereiche beschränkt und verschwindet während der EMT des Sklerotoms. Bei fortschreitender Somitenreifung ist *Paraxis*-Expression nur noch im Bereich des Dermomyotoms zu finden.

Horizontalschnitte durch einen HH 15+-Embryo im Bereich des Rumpfes nach in situ-Hybridisierung mit **c-Paraxis**, Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

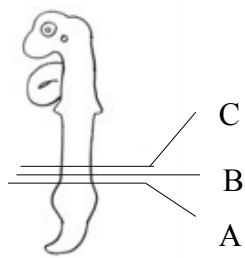


Abbildung 3.19: Horizontaler Schnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 15+-Embryos; **Schnittebene A**; Pfeil: Wolffscher Gang

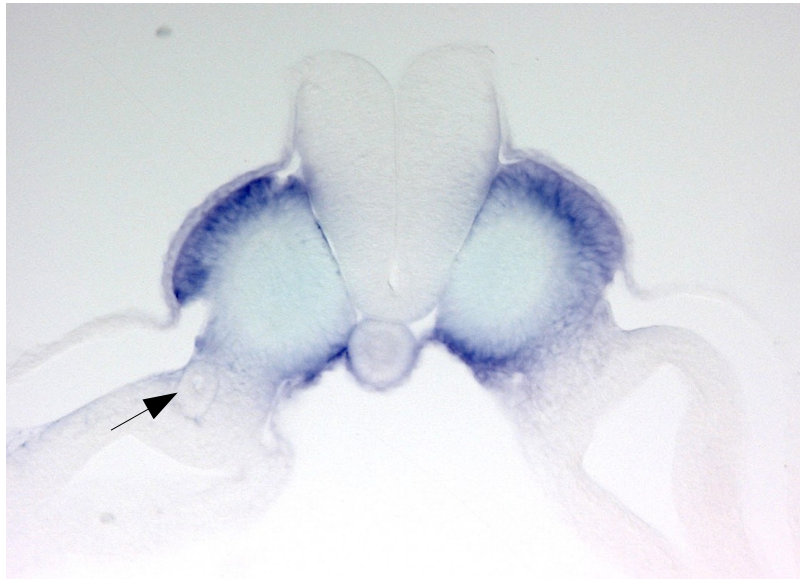


Abbildung 3.20: Horizontaler Schnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 15+-Embryos; **Schnittebene B**; Pfeil: Wolffscher Gang

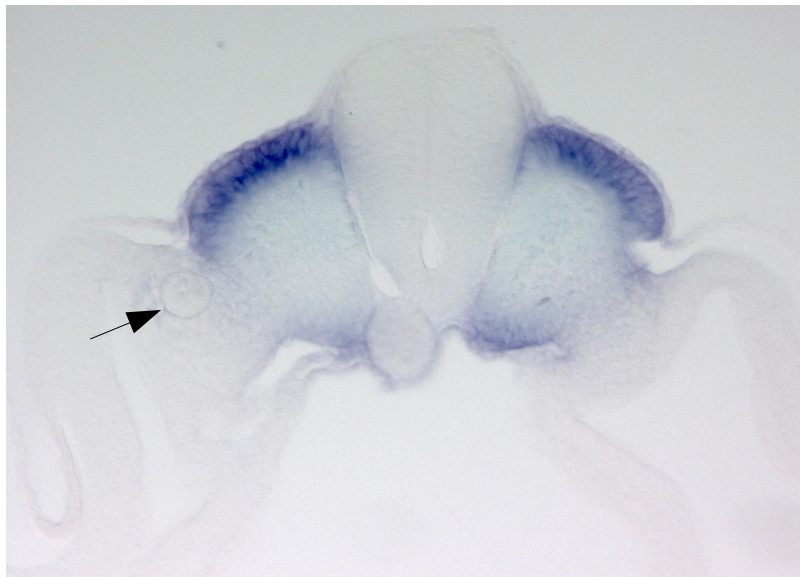
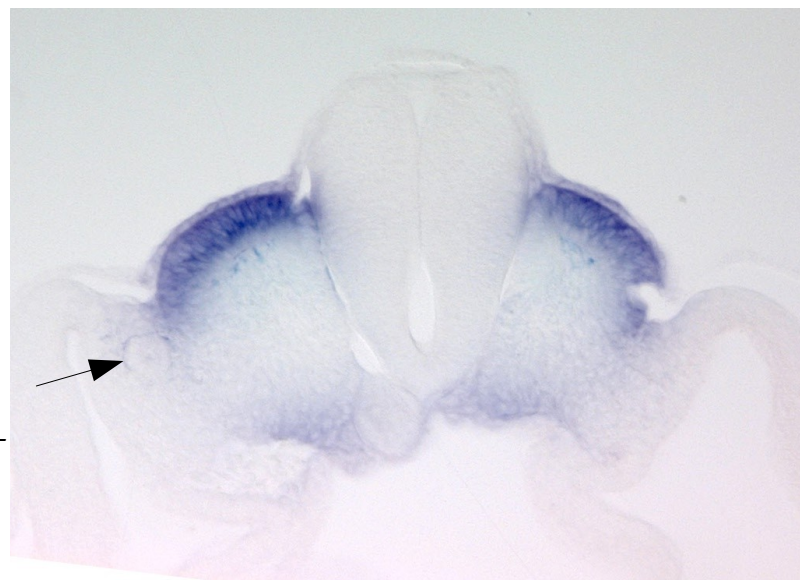


Abbildung 3.21: Horizontaler Schnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 15+-Embryos; **Schnittebene C**; Pfeil: Wolffscher Gang



Horizontalschnitte durch einen HH 15+-Embryo im Bereich des Rumpfes nach in situ-Hybridisierung mit **c-Paraxis**, Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

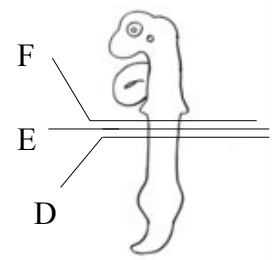
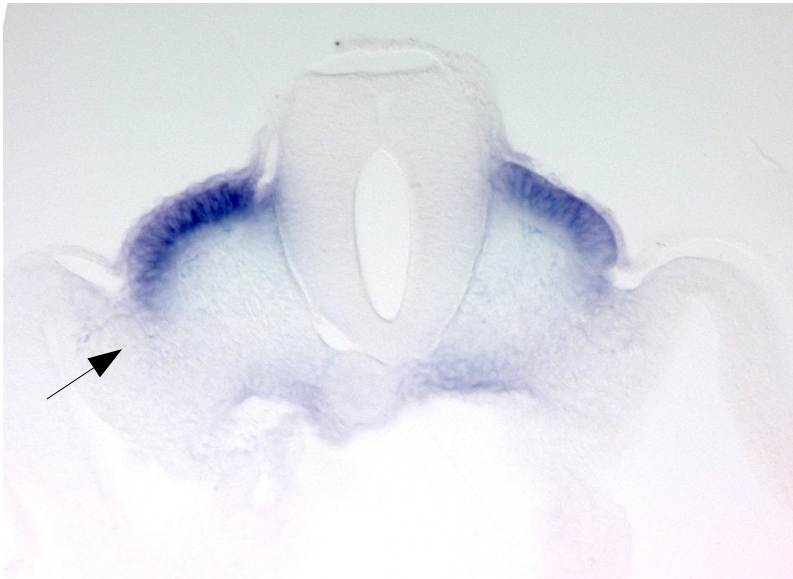


Abbildung 3.22: Horizontaler Schnitt durch einen HH 15-Embryo im mittleren Rumpf; **Schnittebene D**; Pfeil: Wolffscher Gang

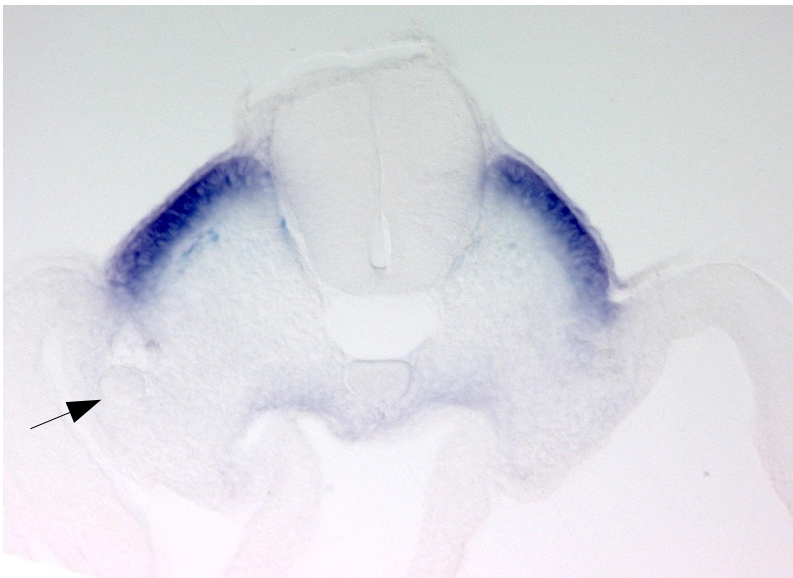


Abbildung 3.23: Horizontaler Schnitt durch einen HH 15-Embryo im kranialen Rumpf; **Schnittebene E**; Pfeil: Wolffscher Gang

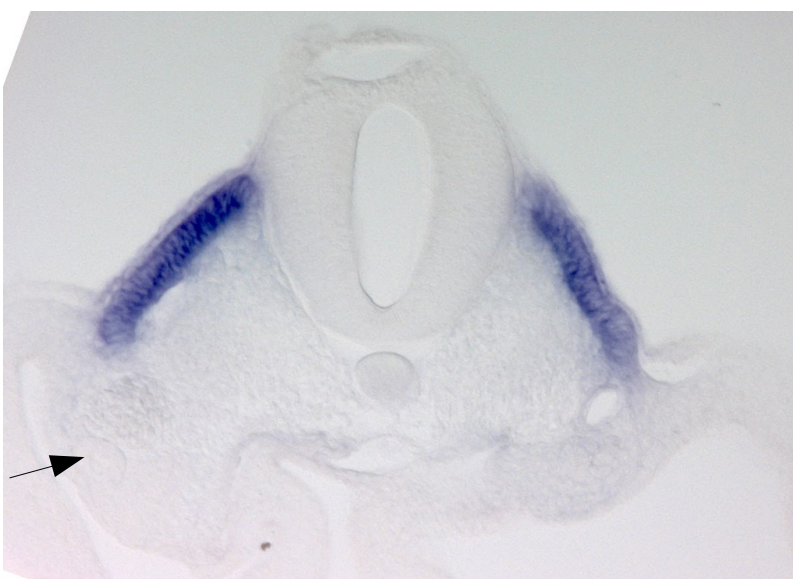


Abbildung 3.24: Horizontaler Schnitt durch einen HH 15-Embryo im kranialen Rumpf; **Schnittebene F**; Pfeil: Wolffscher Gang

3.3.4.2 *Pax3*

Die Abbildungen 3.25 bis 3.30 zeigen das Expressionsmuster von *Pax3*, zur Untersuchung kamen n=4 Embryonen.

Abb. 3.25, wenig kranial der Hinterextremitätenanlage geschnitten, zeigt die in dieser Studie jüngsten Somiten. Diese sind in ihrer Form im Querschnitt noch fast kreisförmig mit einer Abflachung zum Neuralrohr hin. Der Wolffsche Gang liegt hier ventral des sich bildenden Dermomyotoms, er weist noch fast kein Lumen auf. Expression zeigt sich in diesem Schnitt im Bereich des sich bildenden Dermomyotoms, also im dorsolateralen Anteil des Somiten. Das Somitozöl und der ventromediale Anteil des sich bildenden Sklerotoms sind frei von Signalen. Am stärksten ist die *Pax3*-Expression im ventromedialen zukünftigen Dermomyotom, am schwächsten, aber bereits vorhanden, im dorsalen Neuralrohr. In dieser Aufnahme fällt eine Fortsetzung der epithelialen Struktur des Dermomyotoms entlang des Neuralrohres auf, die sich bis neben die Chorda fortsetzt, aber frei von Expression ist. Unterschiede im Seitenvergleich bestehen hier nicht.

In Abb. 3.26 hat der Somit beiderseits etwa Keilform. Der Wolffsche Gang, dessen Lumen hier etwas weiter ist, liegt auf der intakten linken Seite ventral des Dermomyotoms. Die Expression ist in dieser Abb. am Stärksten im ventromedialen Dermomyotom, im Bereich des dorsomedialen Dermomyotoms und des dorsalen Neuralrohres ist sie relativ schwach. Eine eindeutige Lippenbildung ist hier noch nicht zu sehen, jedoch setzt sich in der dorsomedialen Ecke des Dermomyotoms das Epithel nach ventral fort, ohne allerdings eine Expression aufzuweisen.

In Abb. 3.27 betrifft die Expression den Bereich des Dermomyotoms und des dorsalen Neuralrohres, das stärkste Signal ist hier ventromedial im Dermomyotom auszumachen. Die seitliche Ausdehnung des Dermomyotoms ist geringer als in der vorherigen Abbildung, es wirkt etwas schmaler und liegt beiderseits wie eine nach medioventral offene Spange dem Neuralrohr lateral an. Auch hier sind im Seitenvergleich keine Unterschiede zwischen der operierten und der intakten Seite des Embryos auszumachen. Der Wolffsche Gang zeigt ein zunehmend deutlicheres Lumen.

Abb. 3.28 zeigt einen im mittleren Rumpf angefertigten Schnitt. Die *Pax3*-Expression ist auf den Bereich des Dermomyotoms und des dorsalen Neuralrohres beschränkt. Die Signalstärke ist in der ventrolateralen Lippe am Größten. Diese ist in diesem Schnitt weniger nach medial eingerollt. Unterschiede im Expressionsmuster sind im Seitenvergleich nicht auszumachen.

Wie auch in den vorangegangenen Abbildungen fehlt die operativ entfernte Struktur des Wolffschen Ganges ventral der ventrolateralen dermomyotomalen Lippe auf der rechten Seite. Der Somit als Ganzes ist etwas größer, seine Struktur wirkt unverändert. Lediglich die Form des Dermomyotoms ist etwas flacher.

Auch in Abb. 3.29 die einen weiter kranial angefertigten Schnitt darstellt, ist die *Pax3*-Expression auf den Bereich des Dermomyotoms und des dorsalen Neuralrohres beschränkt, und auch hier ist die Signalstärke in der ventrolateralen Lippe am Größten.

In Abb. 3.30 liegt die Schnittebene wenig kaudal der Anlage der Vorderextremitäten. Die Expression von *Pax3* erstreckt sich über den Bereich des gesamten Dermomyotoms und des dorsalen Neuralrohres, und scheint in der ventrolateralen Lippe beiderseits stärker zu sein. Das Expressionsmuster ist jedoch auf beiden Seiten gleich. Deutlich ist auf der rechten Seite ventral der ventrolateralen Lippe des Dermomyotom die Struktur des Wolffschen Ganges mit Lumen zu sehen, die auf der linken Seite fehlt. Der Somit ist insgesamt im Querschnitt dreieckig.

Zusammenfassung

Abschließend betrachtet hat die Ablation des Wolffschen Ganges auch auf die Expression von *Pax3* in den untersuchten Stadien keinen Einfluss. Sie ist auf den Anteil des Somiten beschränkt, der Dermomyotom ist bzw. wird, ist aber durchaus auch im dorsalen Neuralrohr nachzuweisen. Zu Beginn der Somitenreifung scheint sie im ventromedialen Dermomyotom am stärksten zu sein, was sich aber mit zunehmendem Alter immer mehr auf den Bereich der ventrolateralen Lippe konzentriert. Das Sklerotom zeigt keinerlei *Pax3*-Expression. Medial gibt es im jungen Somiten Bereiche epithelialen Gewebes, die keine Expression aufweisen und dem sich bildenden Sklerotom zugeordnet werden.

Horizontalschnitte durch einen HH 16+-Embryo im Bereich des Rumpfes nach *in situ*-Hybridisierung mit **q-Pax3**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

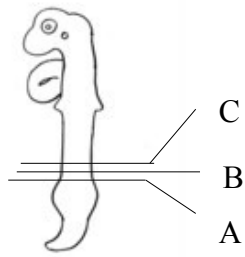


Abbildung 3.25:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines HH 16+-
Embryos; **Schnittebene A**;
Pfeil: Wolffscher Gang

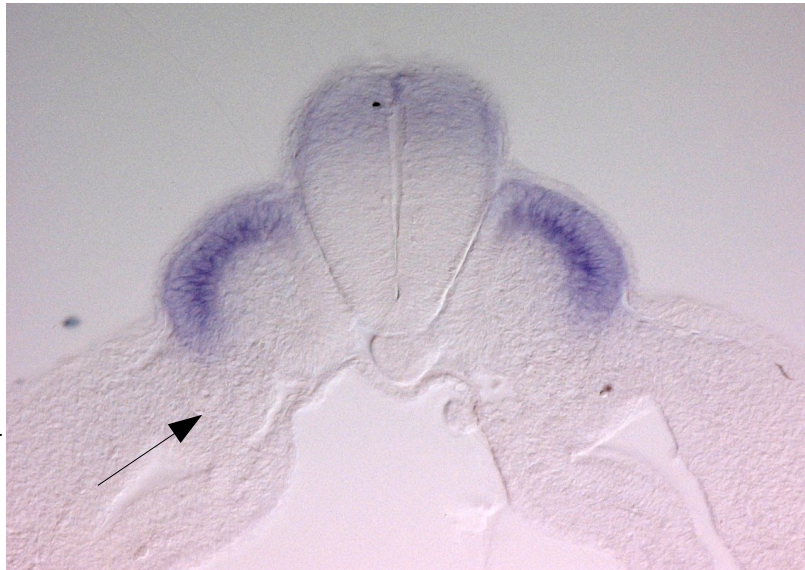


Abbildung 3.26:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene B; Pfeil:
Wolffscher Gang

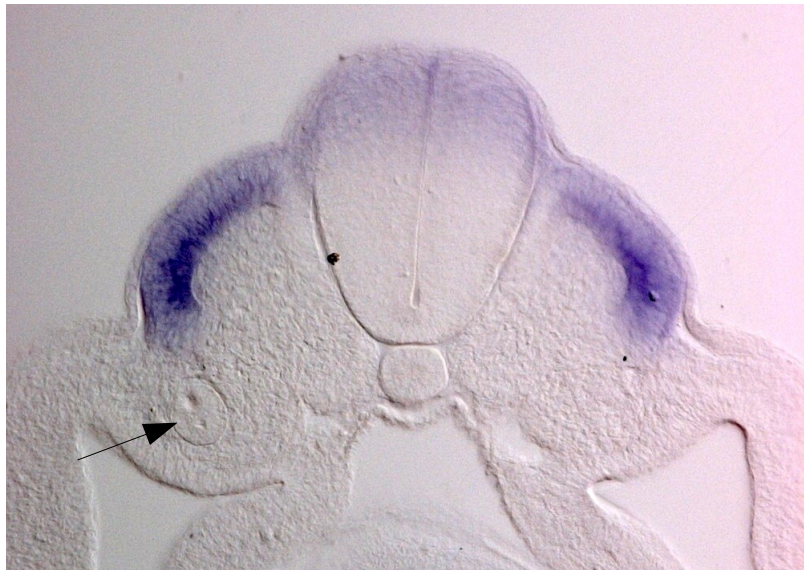


Abbildung 3.27:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene C; Pfeil:
Wolffscher Gang



Horizontalschnitte durch einen HH 16+-Embryo im Bereich des Rumpfes nach in situ-Hybridisierung mit **q-Pax3**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

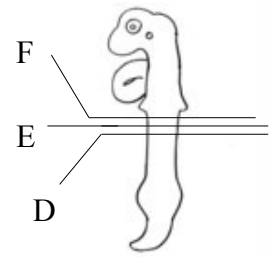


Abbildung 3.28:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene D; Pfeil:
Wolffscher Gang



Abbildung 3.29:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene E; Pfeil:
Wolffscher Gang

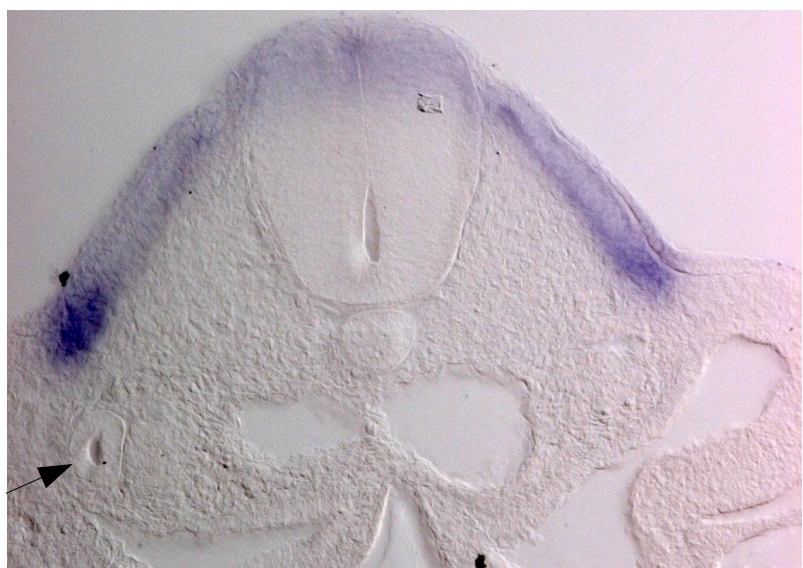


Abbildung 3.30:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines
HH 16+-Embryos;
Schnittebene F; Pfeil:
Wolffscher Gang

3.3.4.3 *MyoD*

Der nächste untersuchte Transkriptionsfaktor ist *MyoD*, ein Marker myotomaler Zellen. Auch bei dieser Untersuchung wurden Schnittebenen zwischen den beiden Extremitätenpaaren gewählt. Hier umfasst die Untersuchung n=4 Embryonen.

Abbildung 3.31 zeigt bilateral-symmetrisch junge Somiten mit nahezu geschlossener epithelialer Randstruktur. Die Schnittebene liegt kranial der Hinterextremitätenanlage. Das Zentrum zeigt sich mesenchymal. Die Form der Somiten ist im Querschnitt fast kreisrund mit Abflachung zum Neuralrohr hin. Eine Expression von *MyoD* ist hier auf epitheliale myogene Vorläuferzellen, die lateral des Neuralrohres liegen, begrenzt. Einziger Unterschied ist in dieser Aufnahme die fehlende Struktur des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite.

Im folgenden Schnitt, Abb. 3.32, ist die Expression auf einen epithelial erscheinenden Anteil des reifenden Somiten lateral des Neuralrohres, etwas weiter dorsal als in der vorigen Schnittebene, begrenzt. Das sich daran dorsal anschließende sich bildende Dermomyotom ist durch eine relativ breite epitheliale Struktur gekennzeichnet, die sich noch weit nach ventromedial fortsetzt, dann eine Unterbrechung in Richtung des intermediären Mesoderms erfährt, um im ventralen Somitenbereich wieder aufzutauchen. Der Somit als Ganzes schmiegt sich so in D-Form mit der geraden Seite zum Neuralrohr an dasselbe an. Differenzen in Expressionsmuster oder Form und Struktur der Somitenderivate sind hier nicht erkenntlich.

Der nächste Schnitt, Abb. 3.33 zeigt bei einem keilförmigen Somit ein noch etwas weiter dorsal, im Bereich unmittelbar ventral der dorsomedialen Lippe angesetztes Signal. Die Expression ist deutlich stärker als in der vorherigen Schnittebene.

In Abb. 3.34 beginnt sich die Expression von *MyoD* im sich bildenden Myotom unter dem Dermomyotom nach lateral auszubreiten. Aufgrund der nicht vollständig geraden Schnittebene ist in diesem Bild die Expression von *MyoD* rechts schwächer als links. Ventral des Übergangs zum Seitenplattenmesoderm ist auch hier wieder die charakteristische Struktur des Wolffschen Ganges auf der nicht operierten Seite zu sehen.

Die nächste Abbildung, Abb. 3.35, ist weiter kranial geschnitten. Auch hier findet eine Expression nur ventral der dorsomedialen Lippe des Dermomyotoms sowie dessen Verlauf wenig nach lateral folgend statt. Auch in diesem Bild gibt es keine Differenzen im Vergleich der beiden Seiten.

Abbildung 3.36 zeigt einen Schnitt im kranialen Rumpf wenig kaudal der Flügelknospen. Deutlich sichtbar ist, wie in den vorangegangenen Aufnahmen, das Fehlen des exstipierten Wolffschen Ganges auf der rechten Seite, dessen Struktur auf der Linken deutlich ventral des Überganges zum Seitenplattenmesoderm auszumachen ist. Dorsal davon liegt die blutgefüllte Kardinalvene, die auch auf der operierten Seite zu sehen ist. Die Expression von *MyoD* ist in dieser Aufnahme bilateral-symmetrisch auf einen Bereich im Winkel der dorsomedialen Lippe des Dermomyotom beschränkt und dehnt sich von diesem ausgehend ein wenig unter dem relativ schmalen Dermomyotom nach lateral aus. Sie markiert erste myotomale Zellen des sich bildenden epaxialen Myotoms. Alle anderen Strukturen zeigen erwartungsgemäß keine Expression. Unterschiede zwischen den beiden Hälften sind nicht ersichtlich.

Zusammenfassung

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse lässt auch für *MyoD* keinen Rückschluss auf einen Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Expression zu. Diese ist bereits im noch epithelialen Somiten lateral des Neuralrohres in einer beschränkten Population myotomaler Vorläuferzellen vorhanden und verlagert sich dann im Verlauf der Somitenreifung nach dorsal in den Bereich der dorsomedialen Lippe des Dermomyotom, um von dort eine Ausbreitung in lateroventraler Ausrichtung unter dem Dermomyotom zu erfahren.

Horizontalschnitte durch einen HH 16-Embryo im Bereich des Rumpfes nach *in situ*-Hybridisierung mit **c-MyoD**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

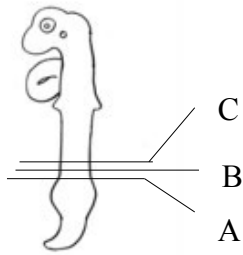


Abbildung 3.31:
Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16-Embryos; **Schnittebene A**; Pfeil: Wolffscher Gang

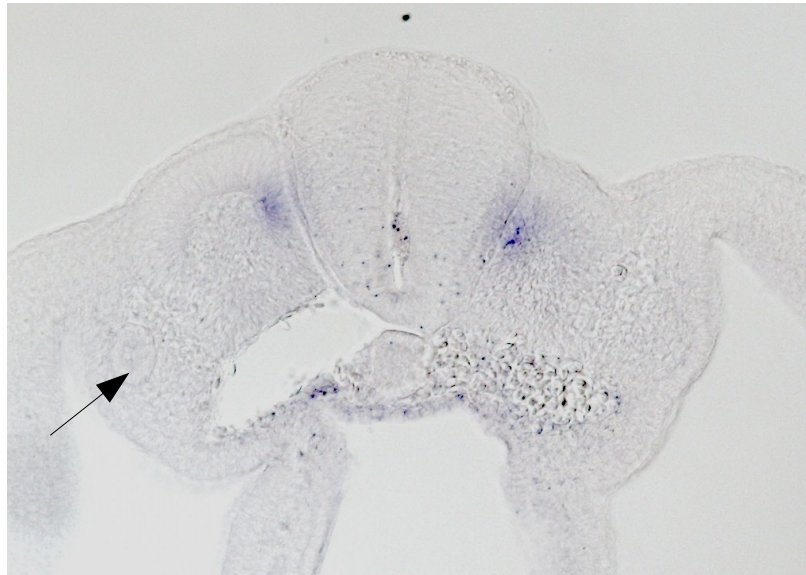


Abbildung 3.32:
Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16-Embryos; **Schnittebene B**; Pfeil: Wolffscher Gang

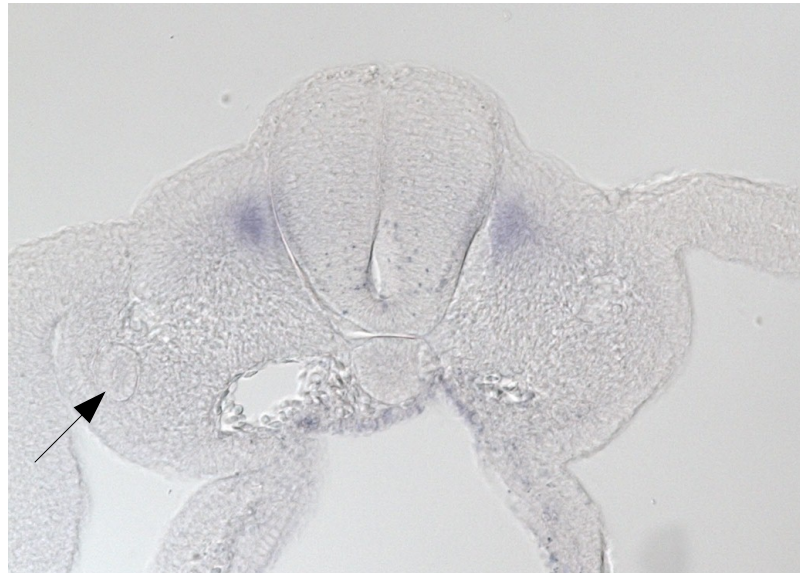


Abbildung 3.33:
Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 16-Embryos; **Schnittebene C**; Pfeil: Wolffscher Gang



Horizontalschnitte durch einen HH 16-Embryo im Bereich des Rumpfes nach in situ-Hybridisierung mit **c-MyoD**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

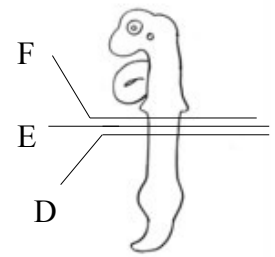
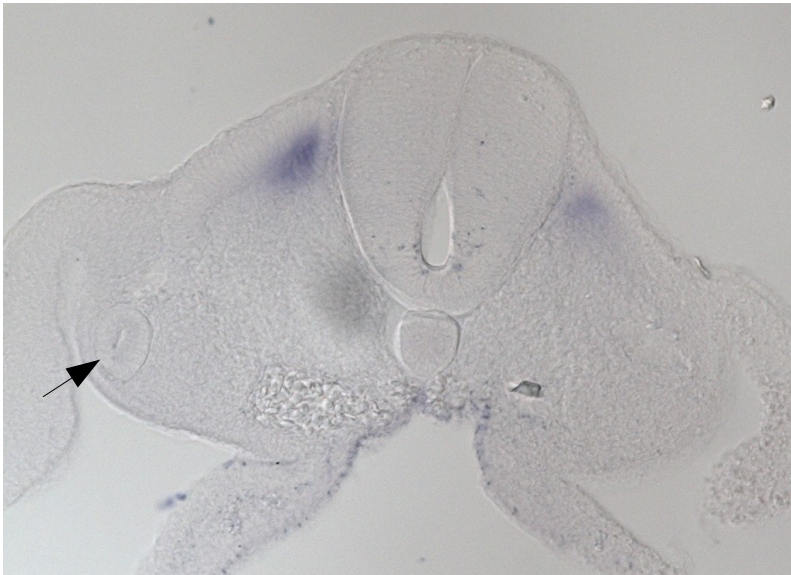


Abbildung 3.34:
Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16-Embryos; **Schnittebene D**; Pfeil: Wolffscher Gang

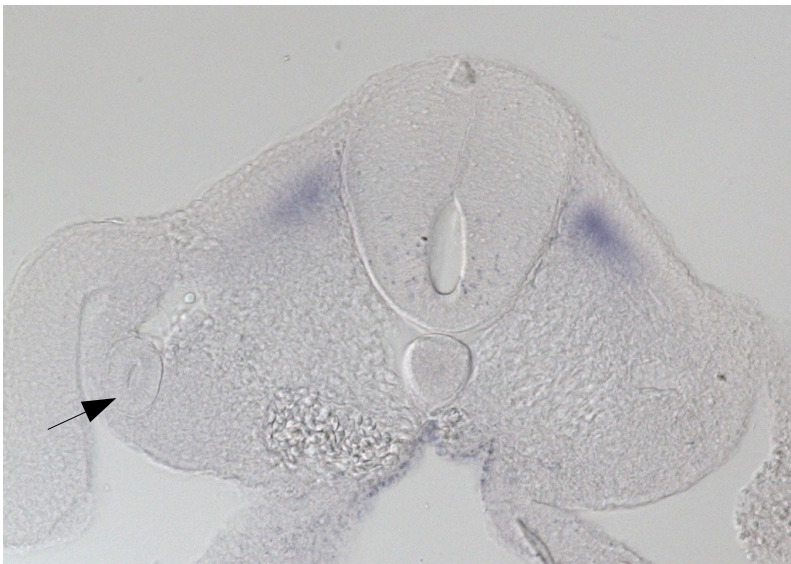


Abbildung 3.35:
Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16-Embryos; **Schnittebene E**; Pfeil: Wolffscher Gang

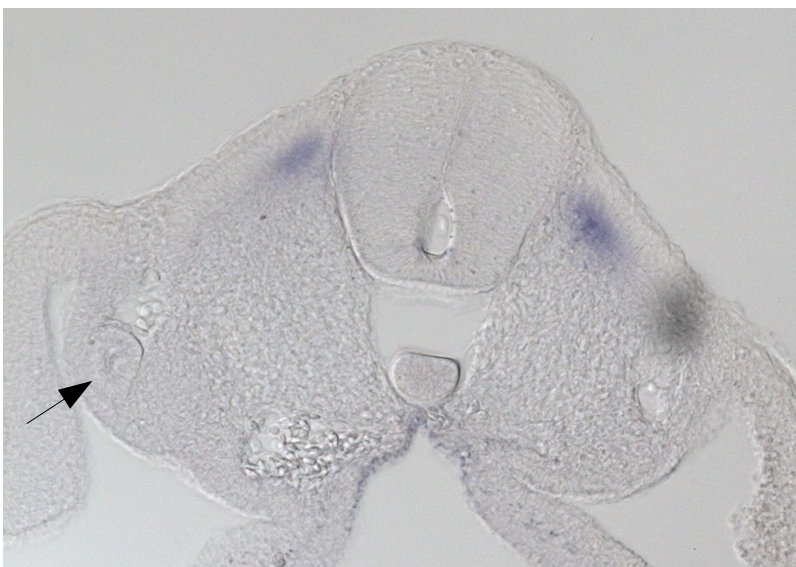


Abbildung 3.36:
Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16-Embryos; **Schnittebene F**; Pfeil: Wolffscher Gang

3.3.4.4 *Pax1*

Als Marker des medialen Sklerotoms wurde nun *Pax1* untersucht. Auch hier liegen die Schnittebenen zwischen den beiden Extremitätenpaaren. Zur besseren Darstellung wurden hier die Schnitte zweier Embryonen verwendet, insgesamt untersucht wurden n=5.

Die erste Schnittebene aus dem kaudalen Rumpf, Abb 3.37, wenig kranial der Anlage der Hinterextremitäten zeigt die in dieser Serie jüngsten Somiten. Ihre Form ist halbkreisförmig, sie zeigen bis auf das ganz ventromediale Sklerotom, wo auch die *Pax1*-Expression lokalisiert ist, noch eine fast geschlossene epitheliale Randstruktur. Die stärkste Expression ist im Bereich des ventromedialen Sklerotoms zu finden. Sie setzt sich aber in abgeschwächter Form noch in dorsolateraler Ausrichtung in den Bereich des zentralen Sklerotoms fort. Bei dieser ansonsten bilateral-symmetrischen Aufnahme fehlt rechts der operativ entfernte Wolffsche Gang.

Die kleinlumige Struktur des Wolffschen Ganges ist auch in Abb. 3.38 nur auf der intakten Seite im intermediären Mesoderm gut zu entdecken. Die bilateral-symmetrischen Somiten haben beiderseits ungefähr Halbkreisform mit der geraden Seite zum Neuralrohr. Die Expression von *Pax1* dehnt sich stärker als in der vorangegangenen Darstellung auf den Bereich des zentralen Sklerotoms aus, die *Pax1*-positive Region ist deutlich größer als in der vorangegangenen Aufnahme. Auffällig ist aber auch hier das flammenförmige, nach dorsolateral schwächer werdende Ausstrahlen in Richtung des Dermomyotoms.

In Abb. 3.39 erfasst die Expression von *Pax1* das ventromediale und Bereiche des zentralen Sklerotom und strahlt zusätzlich flammenförmig nach dorsolateral in Richtung des Dermomyotoms aus. Der Somat zeigt hier Keilform, das Dermomyotom liegt spangenförmig und relativ breit dem Neuralrohr lateral und nach medioventral offen an. Der Wolffsche Gang liegt auf der intakten Seite ventral des Übergangs zum Seitenplattenmesoderm. Die Expression von *Pax1* ist auf beiden Seiten gleich stark.

Die aus dem mittleren Rumpf stammende Abb. 3.40 zeigt ein anderes Bild. Hier konzentriert sich die Expression von *Pax1* ventromedial des Dermomyotoms, ohne die Region der Lippen zu betreffen. Expression im ventralen Sklerotom ist nicht mehr, im zentralen Sklerotom nur wenig auszumachen. Die Achsensymmetrie ist erhalten. Deutlich fällt auf der linken Seite die Struktur des Wolffschen Ganges ins Auge.

Der Schnitt in Abb. 3.41 stammt von etwas weiter kranial. Auch in dieser Aufnahme ist die stärkste Expression ventromedial des Dermomyotom zu finden. Der Bereich der Lippen ist

wie in Abb. 3.40 frei von Expression, die in diesem Schnitt auch deutlich schwächer ausfällt, dafür aber keinen so abrupten Übergang zum zentralen Sklerotom aufweist. Einzige Auffälligkeit ist die im Seitenvergleich rechts fehlende Struktur des Wolffschen Ganges, die Expressionsmuster zeigen sich beiderseits einheitlich.

Abbildung 3.42 zeigt die am weitesten kranial liegende Schnittebene unmittelbar kaudal der Flügelanlage. Gut zu erkennen ist hier die auf der rechten Seite fehlende, auf der linken Seite unter dem Übergang zum Seitenplattenmesoderm gelegene Struktur des Wolffschen Ganges mit deutlichem Lumen. Die Form der Somiten beiderseits von Neuralrohr und Chorda ist in etwa dreieckig. Expression von *Pax1* lässt sich hier hoch dorsal im zentralen Sklerotom unter dem zentralen Dermomyotom nachweisen, der Bereich unter der ventrolateralen und dorsomedialen Lippe zeigt keinerlei Expression. Das Signal ist unmittelbar unter dem Dermomyotom am Stärksten. Es nimmt dann in Richtung auf die Chorda relativ abrupt und deutlich ab und ist im zentralen Sklerotom nur noch als Schatten wahrzunehmen.

Unterschiede im Seitenvergleich bestehen keine.

Zusammenfassung

Zusammenfassend ist hier festzustellen, dass die Entfernung des Wolffschen Ganges auch auf die Expression des Transkriptionsfaktors *Pax1* keinen Einfluss hat. Die Expression findet sich bei relativ jungen Somiten im Bereich des bereits mesenchymalen ventromedialen Sklerotom, um sich während des Prozesses der Somitenreifung über das zentrale Sklerotom letztendlich in dessen dorsale Anteile ventromedial des Dermomyotom zu verlagern, ohne dessen Lippen zu berühren.

Horizontalschnitte durch den Rumpf eines HH **17** Embryos nach in situ- Hybridisierung mit **c-Pax1**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

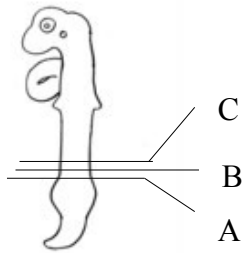


Abbildung 3.37:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines HH 17-
Embryos; **Schnittebene A**;
Pfeil: Wolffscher Gang

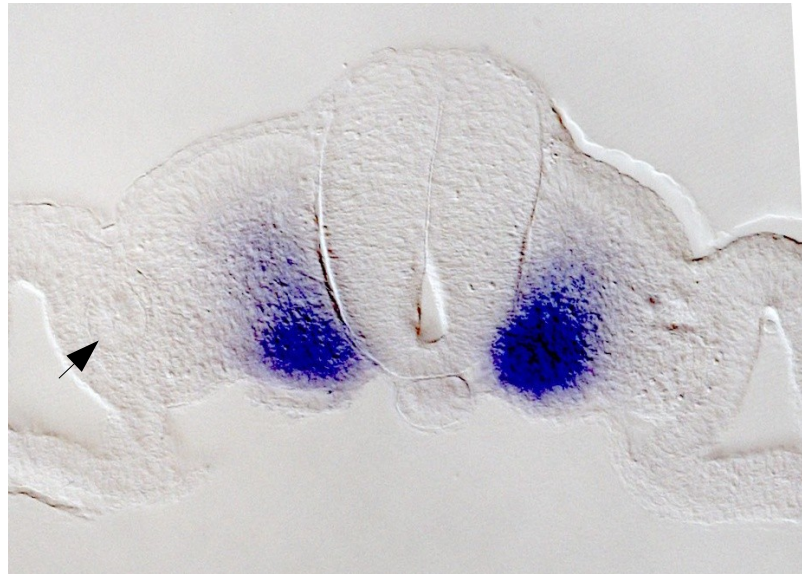


Abbildung 3.38:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines HH 17-
Embryos; **Schnittebene B**;
Pfeil: Wolffscher Gang

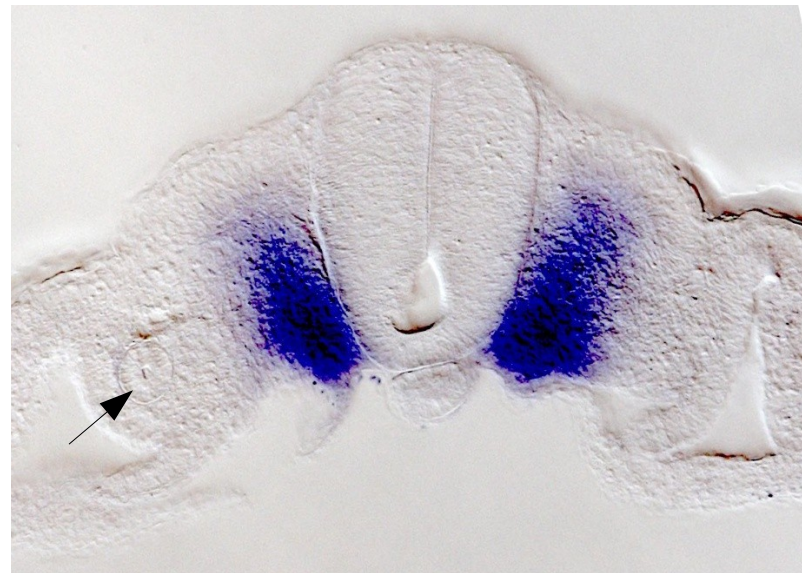
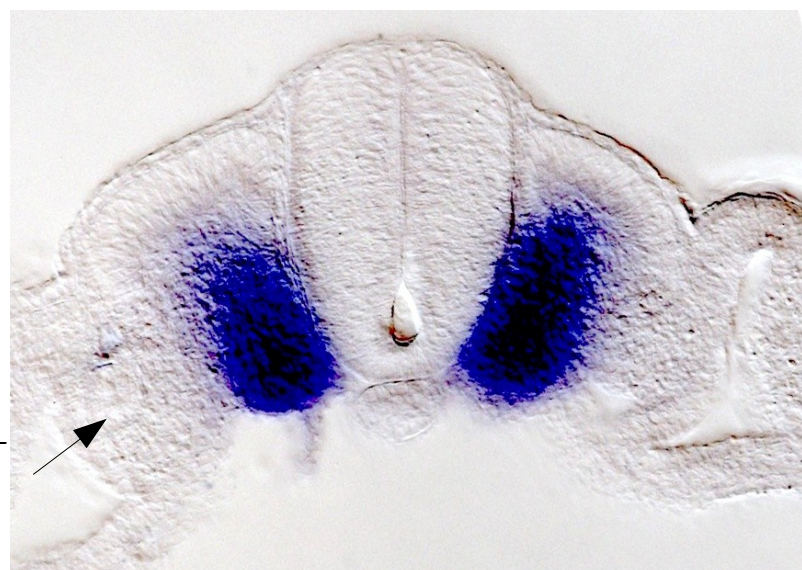


Abbildung 3.39:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines HH 17-
Embryos; **Schnittebene C**;
Pfeil: Wolffscher Gang



Horizontalschnitte durch den Rumpf eines HH 16-Embryos nach in situ- Hybridisierung mit *c-Pax1*; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

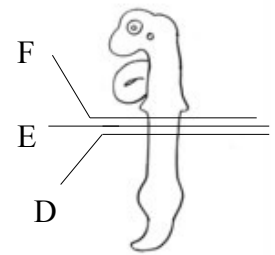
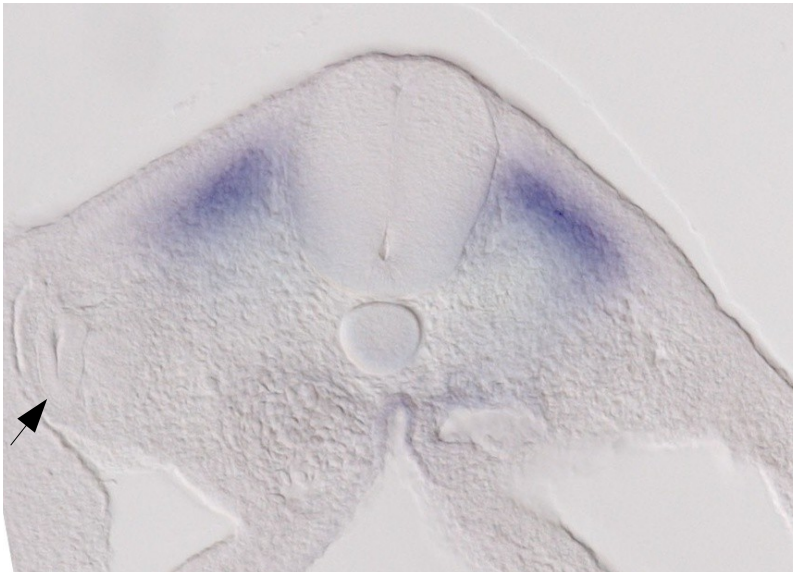


Abbildung 3.40:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines HH 18-
Embryos; **Schnittebene D**;
Pfeil: Wolffscher Gang

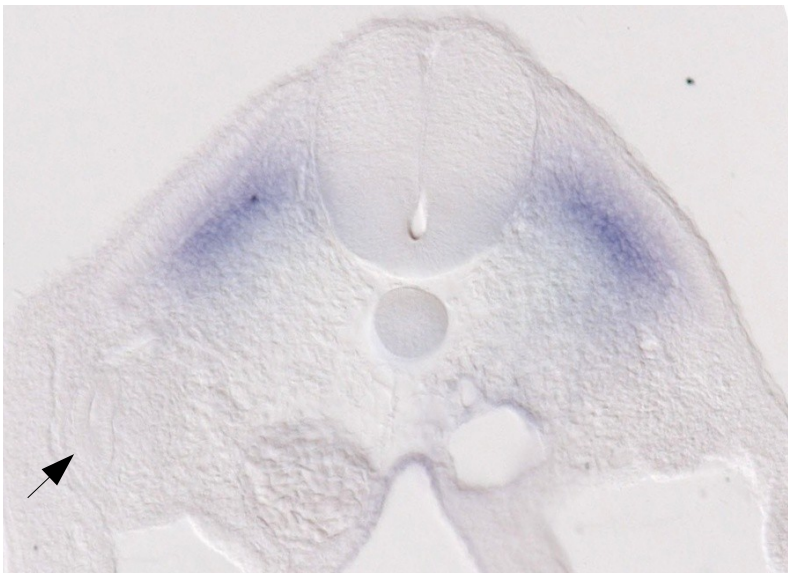


Abbildung 3.41:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines HH 18-
Embryos; **Schnittebene E**;
Pfeil: Wolffscher Gang

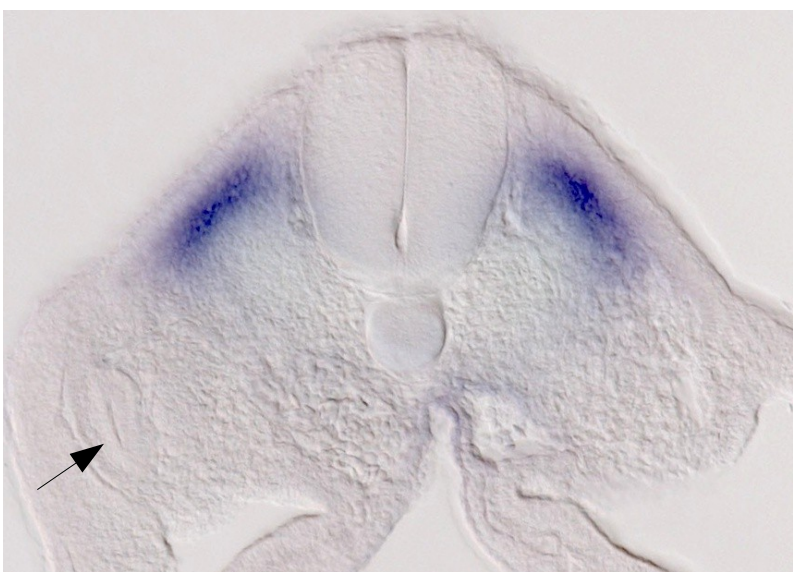


Abbildung 3.42:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines HH 18-
Embryos; **Schnittebene F**;
Pfeil: Wolffscher Gang

3.3.4.5 *Pax9*

Zur weiteren Untersuchung des Sklerotoms wurde *Pax9* eingesetzt. Auch in diesem Fall erforderte eine gute Darstellung die Verwendung mehrerer, in diesem Falle dreier Embryonen. Die Schnittebenen liegen wie schon mehrfach beschrieben zwischen den beiden Extremitätenknospen. Zur Untersuchung kamen n=4 Embryonen.

In Abb. 3.43, einem wenig kranial der Hinterextremitätenknospe angelegten Schnitt, sind die Somiten halbkreisförmig mit der geraden Seite zum Neuralrohr hin ausgerichtet. In diesen noch relativ jungen Somiten ist die Struktur des sich bildenden Dermomyotom relativ breit, und epitheliales Gewebe setzt sich auch noch am Neuralrohr entlang nach ventral fort. Die *Pax9*-Expression ist im ventromedialen und unteren zentralen Sklerotom angesiedelt und auf beiden Seiten des Embryos gleich stark. Schwach ist auf der linken Seite ventral des Übergangs zum Seitenplattenmesoderm der Wolffsche Gang zu erkennen.

Abbildung 3.44 aus dem kaudalen Rumpf zeigt die nächste Schnittebene. Auch in dieser Aufnahme herrscht Achsensymmetrie. Die Expression von *Pax9* erscheint sowohl gleich lokalisiert als auch gleich stark und betrifft vor allem das ventromediale, aber auch das zentrale Sklerotom. Im dorsalen als auch im ventrolateralen Sklerotom ist keine Expression nachweisbar. Der Somit nähert sich in diesem Bild beiderseits der Halbkreisform, im Wolffschen Gang ist nahezu kein Lumen mehr wahrzunehmen.

Die nächste, ebenfalls im mittleren Rumpf angefertigte Schnittebene, Abb. 3.45, zeigt ebenfalls eine bilateral-symmetrische Expression, sowohl in der Verteilung als auch in der Stärke. Auch hier lokalisiert sie sich in der Hauptsache im zentralen Sklerotom, das dorsale und ventrolaterale Sklerotom sind frei von Expression, im ventromedialen ist sie vorhanden, aber abgeschwächt. Die Form der Somiten ist in diesem Schnitt keilförmig, der ventral des sich bildenden Dermomyotoms auf der intakten Seite liegende Wolffsche Gang weist kaum ein Lumen auf.

Die Form der Somiten in Abb. 3.46 ist nahezu keilförmig. Der Bereich des intermediären Mesoderm scheint auf der intakten Seite etwas stärker ausgeprägt zu sein. Unterschiede im Expressionsmuster von *Pax9* gibt es jedoch nicht, wenn man von einem geringfügig stärkeren Signal auf der nicht operierten Seite absieht. Die Expression ist hier vor allem im zentralen und medialen Sklerotom deutlich, die Übergänge zum expressionsfreien dorsalen und ventrolateralen Sklerotom sind allerdings fließend.

In Abb. 3.47 erfasst die *Pax9*-Expression beiderseits den Bereich des gesamten dorsalen und zentralen Sklerotoms und ist durch schmale, signalfreie Streifen gegen das Neuralrohr und das Dermomyotom abgegrenzt. Expression im ventralen Sklerotom ist nicht festzustellen. Die Form der Somiten ist dreieckig, links ist deutlich ventral der ventrolateralen Lippe des Dermomyotoms die Struktur des Wolffschen Ganges zu erkennen, die die einzige „Störung“ der bilateralen Symmetrie darstellt.,

In Abb. 3.48 liegt die Schnittebene direkt kaudal der Vorderextremitätenanlage. Auch hier ist die Achsensymmetrie ungestört, die Expression von *Pax9* scheint auf der nicht operierten Seite geringfügig stärker zu sein.

Zusammenfassung

Auch diesen Transkriptionsfaktor betreffend lässt sich bis auf kleine Abweichungen in der Expressionsstärke keinerlei Rückschluss auf tiefgreifende Veränderungen durch die Entfernung des Wolffschen Ganges ziehen. Die untersuchten Embryonen wiesen in jungen Stadien eine auf das medioventrale und zentrale Sklerotom beschränkte Expression von *Pax9* auf, die sich mit zunehmender Reifung über das zentrale Sklerotom in R des dorsalen Sklerotoms verlagerte.

Die von Heim (Dissertation 2011) beschriebene zum intermediären Mesoderm hin beginnende EMT kann in allen Serien bestätigt werden.

Horizontalschnitte durch den Rumpf von HH 15+; HH 16 und HH 17-Embryonen nach in situ-Hybridisierung mit **c-Pax9**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

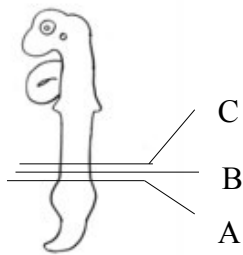


Abbildung 3.43:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines HH 15+-
Embryos; **Schnittebene A**;
Pfeil: Wolffscher Gang

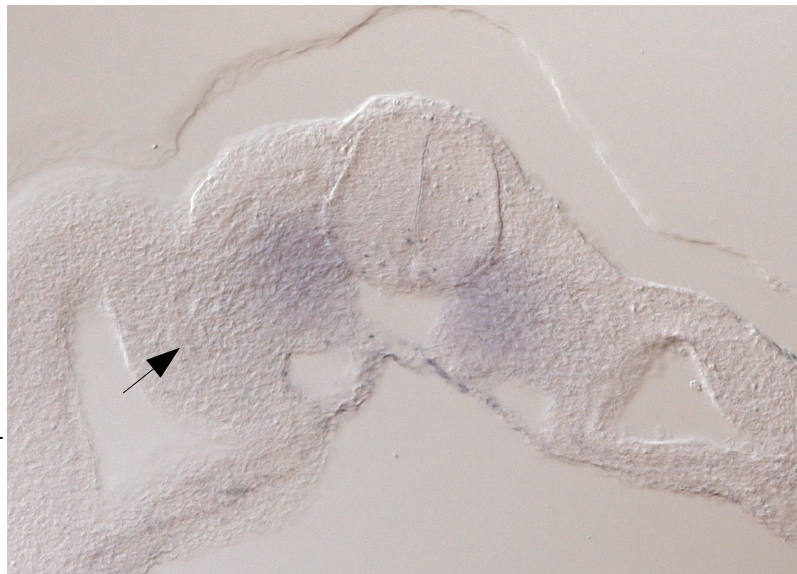


Abbildung 3.44:
Horizontalschnitt durch den
kaudalen Rumpf eines HH 15+-
Embryos; **Schnittebene B**; Pfeil:
Wolffscher Gang

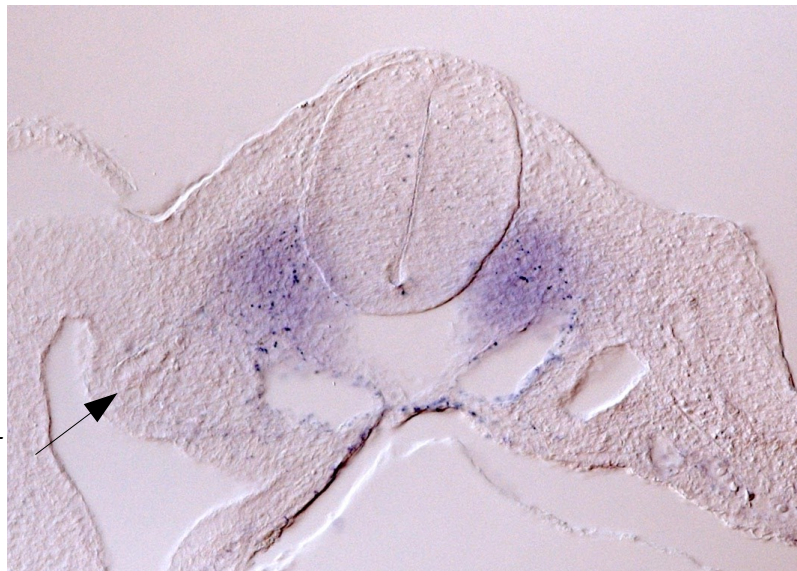
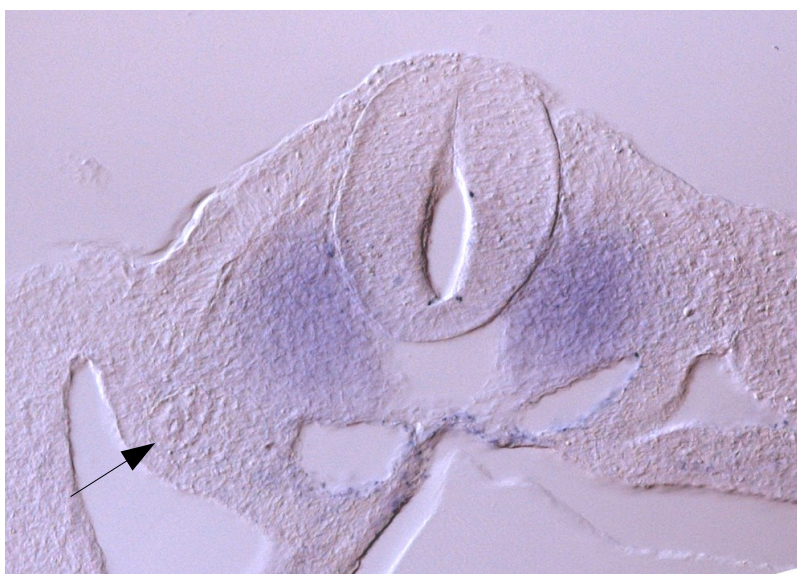


Abbildung 3.45:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines HH 17-
Embryos; **Schnittebene C**;
Pfeil: Wolffscher Gang



Horizontalschnitte durch den Rumpf von HH 15+; HH 16 und HH 17-Embryonen nach in situ-Hybridisierung mit **c-Pax9**; Lichtmikroskop, Vergrößerung 20-fach

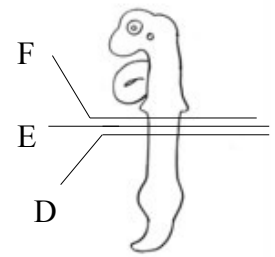
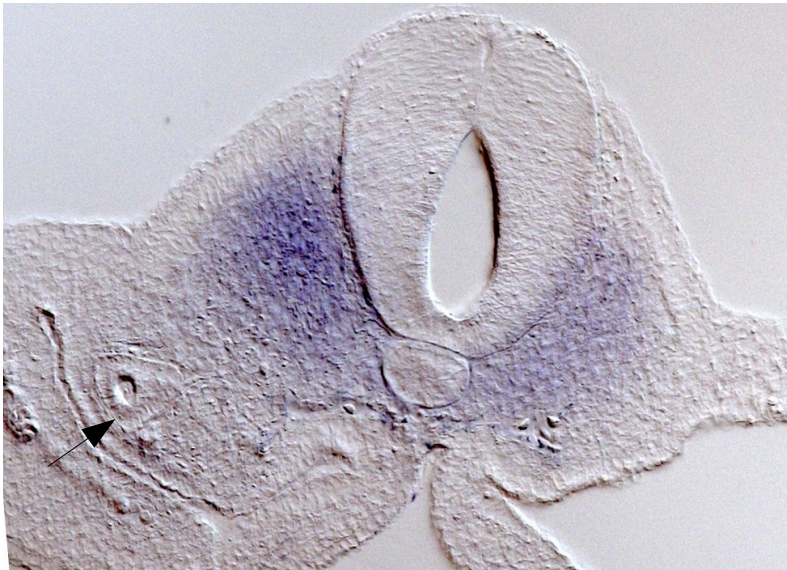


Abbildung 3.46:
Horizontalschnitt durch den
mittleren Rumpf eines HH 17-
Embryos; **Schnittebene D**;
Pfeil: Wolffscher Gang

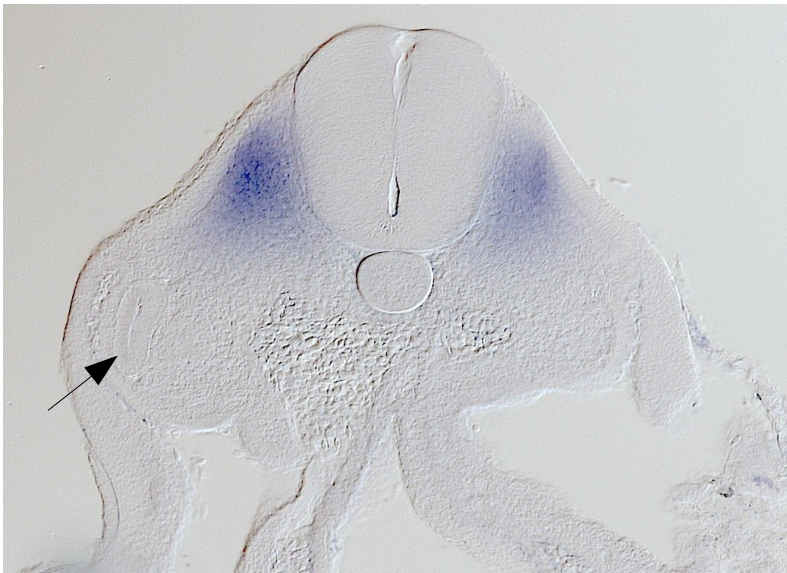


Abbildung 3.47:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines HH 18-
Embryos; **Schnittebene E**;
Pfeil: Wolffscher Gang

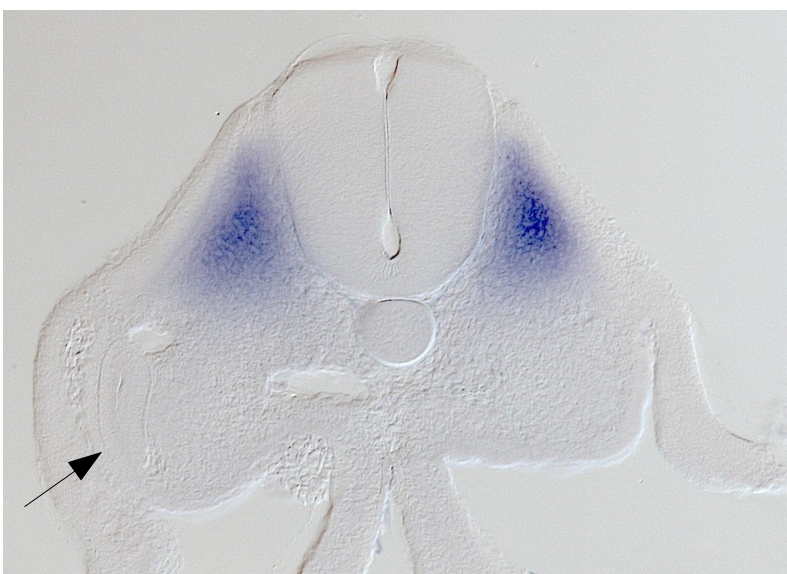


Abbildung 3.48:
Horizontalschnitt durch den
kranialen Rumpf eines HH 18-
Embryos; **Schnittebene F**;
Pfeil: Wolffscher Gang

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Betrachtet man die Entwicklung reifender Somiten, so ist eine EMT bei allen in dieser Studie untersuchten Embryonen zuerst in der Lumbalregion im Bereich des ventrolateralen Somiten festzustellen, der Region, an die sich unmittelbar das intermediäre Mesoderm anschließt. Durchgehend sind junge Somiten zu Beginn ihrer dorso-ventralen Kompartimentierung durch diese Veränderung gekennzeichnet.

Da die EMT im ventrolateralen Bereich der jungen Somiten beginnt, liegt die Vermutung nahe, dass von Seiten der prägnantesten Struktur des angrenzenden intermediären Mesoderms, des Wolffschen Ganges, eine Signalwirkung ausgeht, die direkten Einfluss auf die Somitenentwicklung nimmt. Diese Hypothese erscheint plausibel, weil von vielen die Somiten umgebenden Strukturen wie Chorda, Neuralrohr, Ektoderm und Seitenplattenmesoderm Signale bekannt sind, die auf die Somitenentwicklung unmittelbaren Einfluss nehmen, und ohne die die Reifung der Somiten und Ausbildung ihrer Derivate nicht möglich wäre (Fan und Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994; Spence et al., 1996; Susic et al., 1997; Ikeya und Takada, 1998; McMahon et al., 1998).

Bekannt ist ein solcher Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Entwicklung der Somiten aber nicht, lediglich Monsoro-Burq et al. (1996) nennen ein von der Nierenanlage ausgehendes BMP4-Signal mit hemmendem Einfluss auf die *Pax1*-Expression im lateralen Sklerotom.

Ziel der Studie war nun die vergleichende Untersuchung der Somitenstruktur und -reifung in Abhängigkeit vom Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein des Wolffschen Ganges. Dazu wurde wie oben ausgeführt auf der rechten Seite von Embryonen der Stadien HH 8 bis HH 14 die proliferierende und migrierende mesenchymale Spitze des Wolffschen Ganges unter Schonung der umliegenden Strukturen entfernt. Zum Vergleich diente jeweils die linke, nicht operierte Seite. Der Zeitpunkt der Operation wurde in diesem Zeitrahmen gewählt, weil die Struktur des Wolffschen Ganges erst ab dem Stadium HH 8 überhaupt sichtbar wird. Ab HH 13 verlagert er sich jedoch nach ventrolateral neben die Aorta und ist von dieser in späteren Stadien z.T. überlagert bzw. nicht mehr ohne Substanzverlust von ihr zu trennen. Dies führt dann letztendlich zu Deformationen und damit beschränkter Aussagekraft oder aber einem Verlust der operierten Embryonen.

Die mesenchymale Spitze des Wolffschen Ganges wurde in Anlehnung an die Angaben von Hiruma und Nakamura, (2003) jeweils über den in Abschnitt 2.3.7 beschriebenen Bereichen entfernt, um ein weiteres Auswachsen mit Sicherheit zu verhindern.

Zur Untersuchung stand also der Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenreifung mit Bildung der drei Kompartimente Dermomyotom, Myotom und Sklerotom, die sich aus dem epithelialen Somiten entwickeln. Der Reifungsprozess schreitet, wie in vielen Arbeiten beschrieben und auch in dieser Studie verifiziert, von kaudal nach kranial fort.

Die hier angewandten Verfahren der *in situ*-Hybridisierung und der Immunhistochemie sind sehr spezifisch für die jeweiligen Expressionsdomänen, konkrete Aussagen zur Korrelation der Intensität des Farbsignals und der Expressionsintensität können auf dieser Basis aber nicht getroffen werden.

So ist z.B. die direkte Ableitung der Transkriptionsaktivität eines Gens von der Farbreaktion der *in situ*-Hybridisierung mit Vorsicht zu genießen, da auch andere Faktoren wie Gewebepenetration, freiliegende Bindungsstellen sowie individuelle Besonderheiten der jeweiligen experimentellen Bedingungen einen Einfluss auf die ersichtliche Signalstärke haben. Zudem sind die Unterschiede in der Expressionsstärke gerade bei den Vibratomschnitten meist nur marginal und lassen eine eindeutige Interpretation nicht zu.

Gegenstand der Untersuchung war hier also die Frage, ob und wann eine veränderte Expression verschiedener Markergene nach einseitiger Ablation des Wolffschen Ganges stattfindet.

4.2 Einfluss auf die Sklerotomentwicklung

Fokussiert man sich auf die Entwicklung des Sklerotoms, des ersten vom Somiten durch EMT gebildeten Kompartimentes, das aus den ventralen 2/3 des Somiten sowie den Zellen des Somitozöls entsteht, so sind in dieser Studie im Seitenvergleich sowohl histologisch als auch auf molekularer, mRNA-Ebene keine Unterschiede in der Entwicklung abhängig von der An- bzw. Abwesenheit des Wolffschen Ganges wahrzunehmen. Während sich in Schnitten im kaudalen Rumpf die von der Chorda und der Bodenplatte des Neuralrohres über Shh induzierte *Pax1*-Expression auf das ventromediale Sklerotom beschränkt, lokalisiert sich die von *Pax9* sowohl ventromedial als auch zentral. Die Ausdehnung im Zuge der Somitenreifung erfolgt im Falle von *Pax1* beiderseits in dorsolateraler Ausrichtung, um sich dann letztendlich im kranialen Rumpf am dorsolateralen Rand des zentralen Sklerotom zu manifestieren. Diese Ergebnisse sind nur zum Teil übereinstimmend mit den Resultaten in der Literatur, wo eine

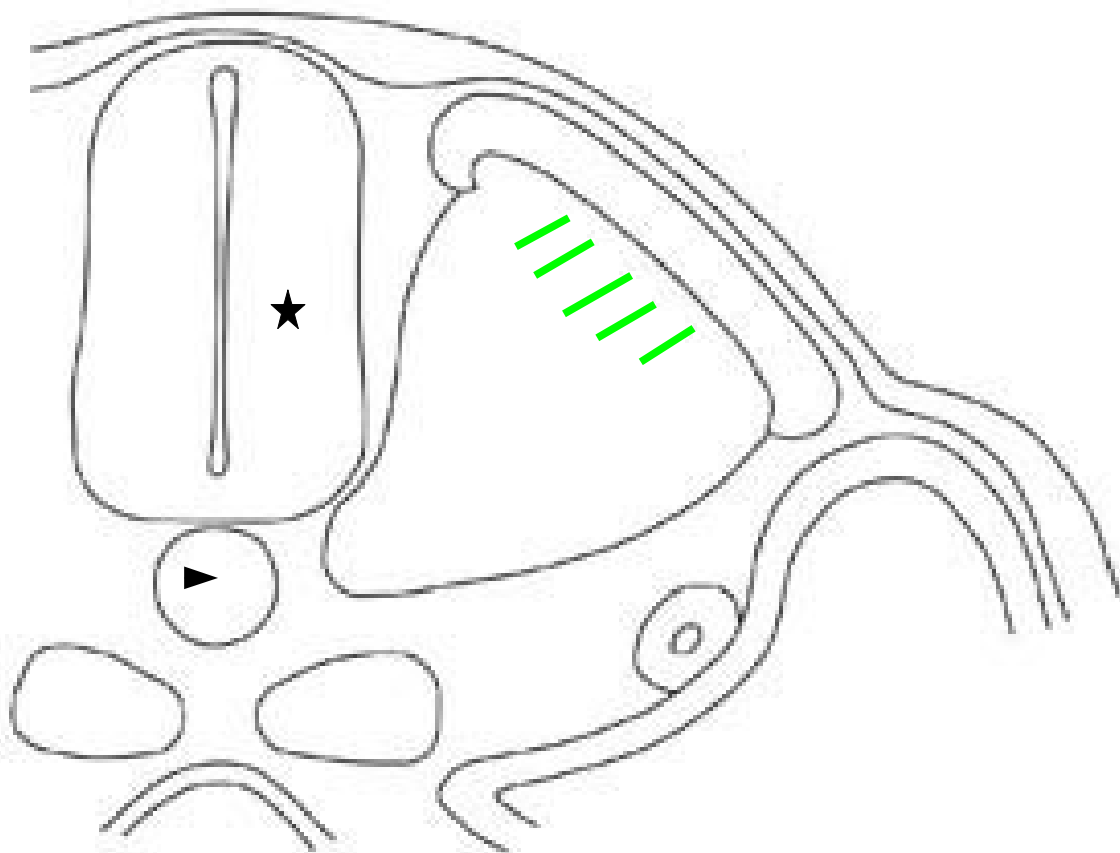
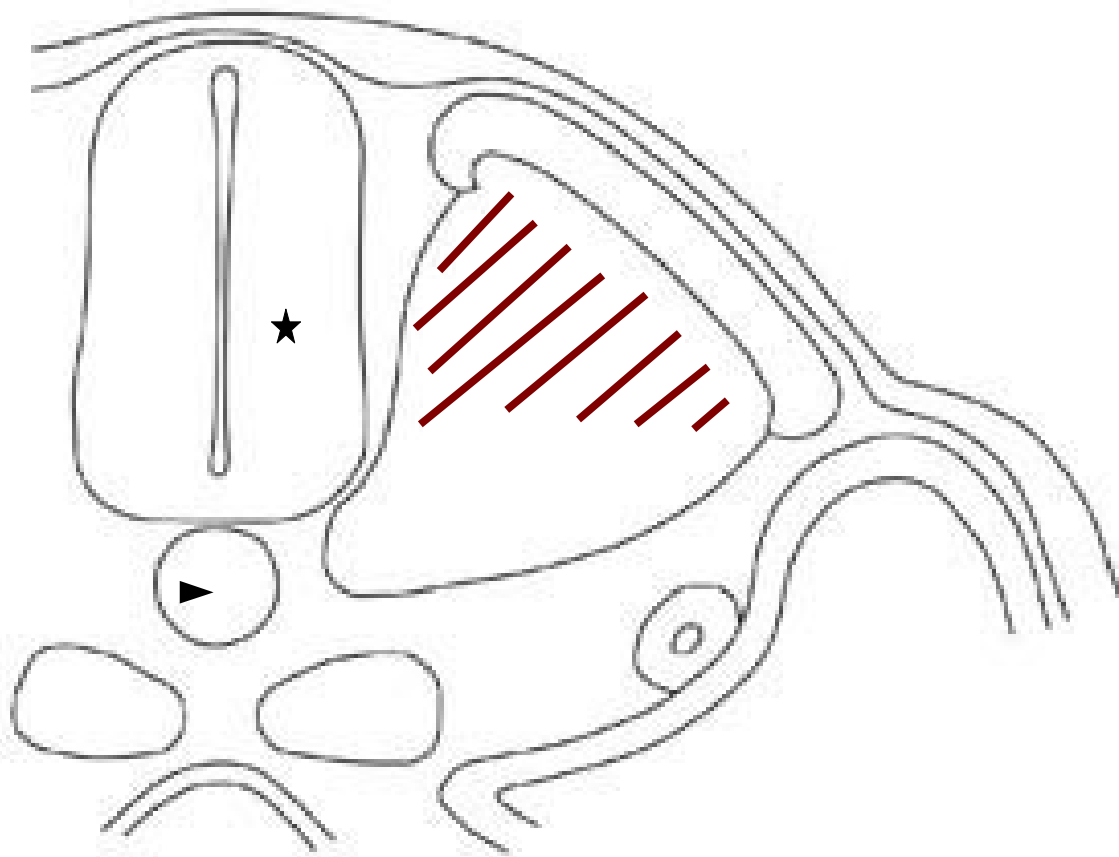


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Expressionsmuster von Pax 9 (rot) und Pax1 (grün) beim reifen Somiten; Pfeilspitze: Chorda dorsalis; Stern: Neuralrohr

zuerst den ganzen ventralen Somiten betreffende, dann aber auf den caudomedialen Anteil des Somiten beschränkte Expression beschrieben wird (Balling et al., 1996) und die Entwicklung des dorsalen Sklerotom von diesem Transkriptionsfaktor vollkommen unabhängig zu sein scheint (Christ et al., 2004). Die von Monsoro-Burq et al. (1996) beschriebene, von BMP4 aus der Nierenanlage ausgehende Hemmung der *Pax1*-Expression im lateralen Sklerotom zeigt sich in den hier vorgestellten Experimenten unbeeindruckt vom Nicht-Vorhandensein des Wolffschen Ganges.

Auch *Pax9*, ein *Pax1* sehr ähnlicher Transkriptionsfaktor, der ebenfalls im Sklerotom exprimiert wird, entwickelt unabhängig von der Anwesenheit des Wolffschen Ganges sein charakteristisches Expressionsmuster. Dieses deckt sich in der vorliegenden Arbeit auch nicht vollständig mit den Literaturangaben. So konzentriert sich laut Balling et al., (1996), die Expression auf den latero-posterioren Abschnitt, während in eigenen Untersuchungen zwar in relativ jungen Somiten, die am Beginn der Reifung stehen, dort ein Signal aufzufinden ist, dieses jedoch im medio-zentralen Somiten deutlich stärker ist und sich mit zunehmender Reifung auf den Bereich des zentralen und dorsalen Sklerotom verlagert. Forschungsobjekt in der von Balling et al., (1996), beschriebenen Studie waren allerdings Mäuse, so dass man auch speziesspezifische Unterschiede in Betracht ziehen muss. Von Christ et al., (2004) wird eine von *Pax1* und *Pax9* unabhängige Entwicklung des dorsalen Sklerotom beschrieben. Diese Aussage ließ sich in dieser Studie bestätigen.

4.3 Einfluss auf die Dermomyotomentwicklung

Aus den Zellen des dorsalen 1/3 des Somiten, die nicht an der sklerotomalen EMT teilnehmen, entwickelt sich das zweite Kompartiment in der Somitenreifung, das Dermomyotom. Es breitet sich zu Beginn der Reifung kuppelförmig in mediolateraler Ausrichtung über dem mesenchymalen Sklerotom aus, um sich dann zunehmend zu einem annähernd rechteckigen Blatt abzuflachen, auszudehnen und an den Rändern lippenähnliche Einwölbungen auszubilden. Mit der Abfaltung des Embryos richtet es sich dann stärker dorsoventral aus (Scaal et Christ, 2004). Die Markergene, die in dieser Studie zur Untersuchung des Dermomyotoms und der epithelialen Strukturen des Somiten eingesetzt wurden, sind *Paraxis* und *Pax3*.

Paraxis ist ein Epithelialisierungsfaktor und deshalb schon mit dem Beginn der Epithelialisierung im gesamten jungen Somiten exklusive des Somitozöls sowie auch schon vorher im unsegmentierten paraxialen Mesoderm vorhanden (Christ et al., 1998; Christ et al.,

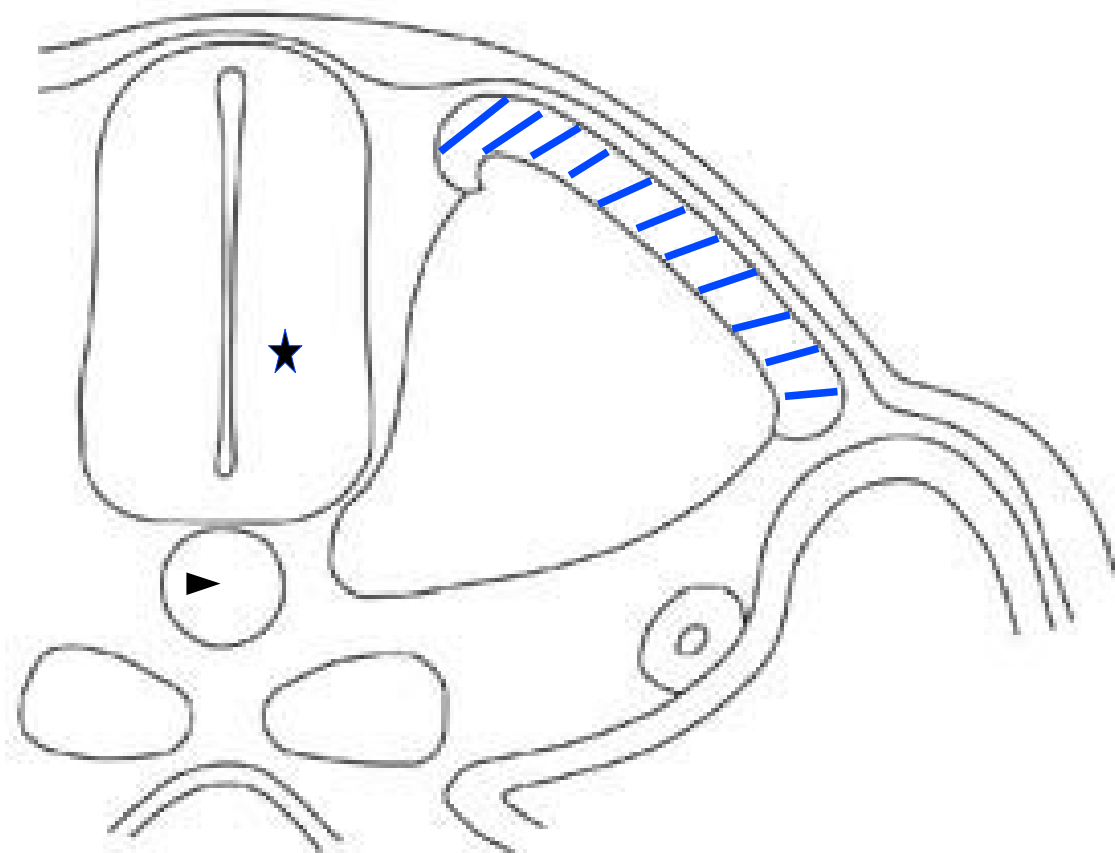
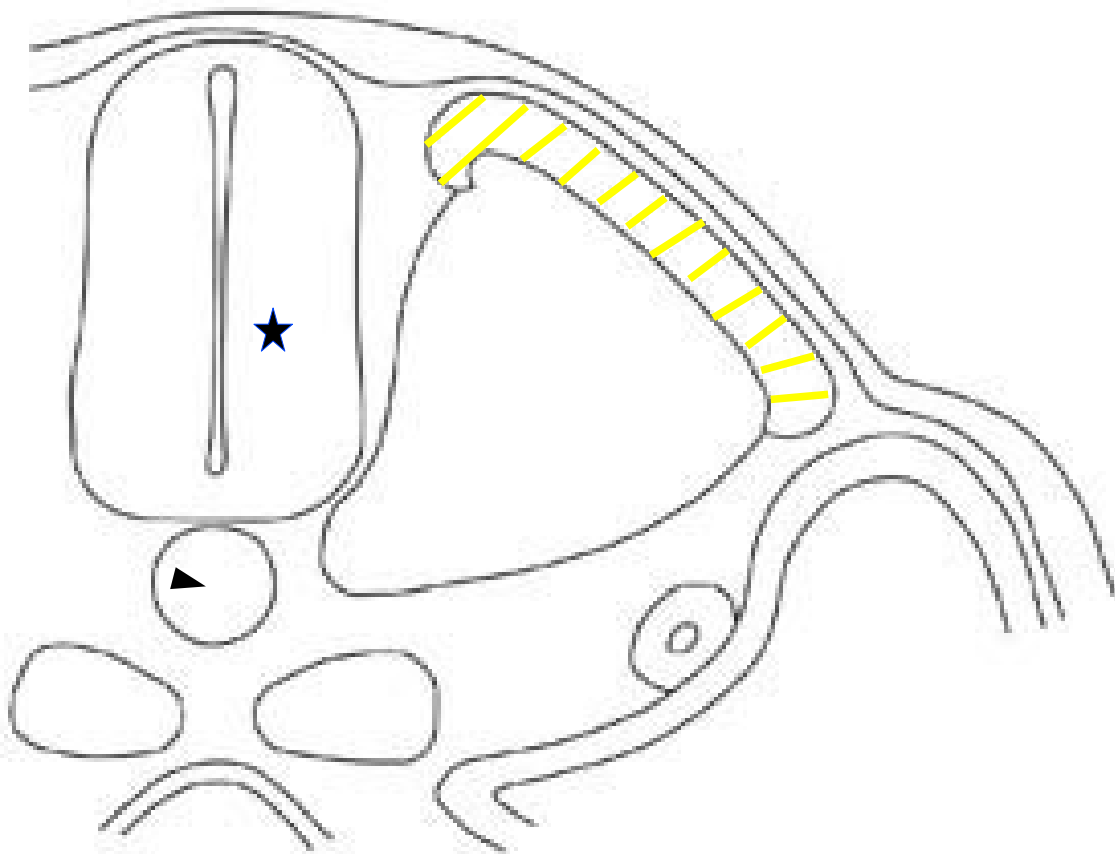


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Expressionsmuster von Paraxis (gelb) und Pax3 (blau) beim reifen Somiten; Pfeilspitze: Chorda dorsalis; Stern: Neuralrohr

2007; Stockdale et al., 2000; Wilson-Rawls et al., 1999). Seine Expression ist abhängig von Signalen aus dem darüber liegenden Ektoderm (Christ et al., 1998; Sosic et al., 1997). Mit zunehmender Reifung beschränkt sich die Expression auf das Dermomyotom, wo *Paraxis* die epitheliale Struktur erhält (Linker et al., 2005). Die Expression scheint von der Anwesenheit des Wolffschen Ganges gänzlich unabhängig zu sein. Es können nach unilateraler Ablation keine Unterschiede im Expressionsmuster auf beiden Seiten des Embryos festgestellt werden. Gut sichtbar zu machen ist jedoch anhand der Bilderserie der Prozess der Somitenreifung einhergehend mit dem Verlust epithelialer Organisation beginnend im ventrolateralen Somiten mit Ausrichtung auf das intermediäre Mesoderm. Mit zunehmender EMT im Sklerotom und Abgrenzung des Dermomyotoms scheint sich die *Paraxis*-Expression letztendlich hauptsächlich auf den Bereich des zentralen Dermomyotoms zu reduzieren und scheint in den Lippen schwächer ausgeprägt.

Ein zweiter Marker für den Bereich des Dermomyotom ist *Pax3*. Seine Expression wird über Wnt-Signale aus axialen Strukturen induziert und über diese sowie BMP4 aus dem Seitenplattenmesoderm erhalten und erfasst zuerst das gesamte paraxiale Mesoderm (Brand-Saberi et al., 1996; Wilson-Rawls et al., 1999). Auch *Paraxis* greift in die Regulation von *Pax3* mit ein: wenn die *Pax3*-Expression im ventralen Somiten nachlässt, ist der erste Schritt der dorso-ventralen Kompartimentierung getan (Wilson-Rawls et al., 1999; Williams and Ordahl., 1994). Die *Pax3*-Expression ist dann zunehmend auf den Bereich des sich bildenden Dermomyotoms beschränkt, allerdings ohne dessen dorsomediale Lippe zu erfassen. Ein direkter Zusammenhang zwischen epithelialer Struktur und *Pax3*-Expression ist hier nicht zu bemerken, ist doch bei jungen Somiten in ventralen Regionen durchaus noch epitheliale Struktur ohne ersichtliche *Pax3*-Expression vorhanden. Auch für diesen Transkriptionsfaktor scheint ein unmittelbarer Einfluss des Verlusts des Wolffschen Ganges nicht gegeben, vielmehr sehen wir auch hier auf beiden Seiten des Embryos gleiche Expressionsmuster.

4.4 Einfluss auf die Myotomentwicklung

Ein Derivat des Dermomyotoms ist das Myotom, die erste Anlage der sich entwickelnden Skelettmuskulatur des Rumpfes. Es entsteht durch Translokation *Pax3*-positiver dermatomyotomaler Zellen nach ventral und deren Entwicklung zu myotomalen Myocyten (Gros et al., 2004; Brand-Saberi et al., 1996).

Initiiert wird die Myogenese im epithelialen Somat durch Shh aus Chorda und Bodenplatte des Neuralrohres, aufrecht erhalten und reguliert wird sie durch BMP4 aus dem

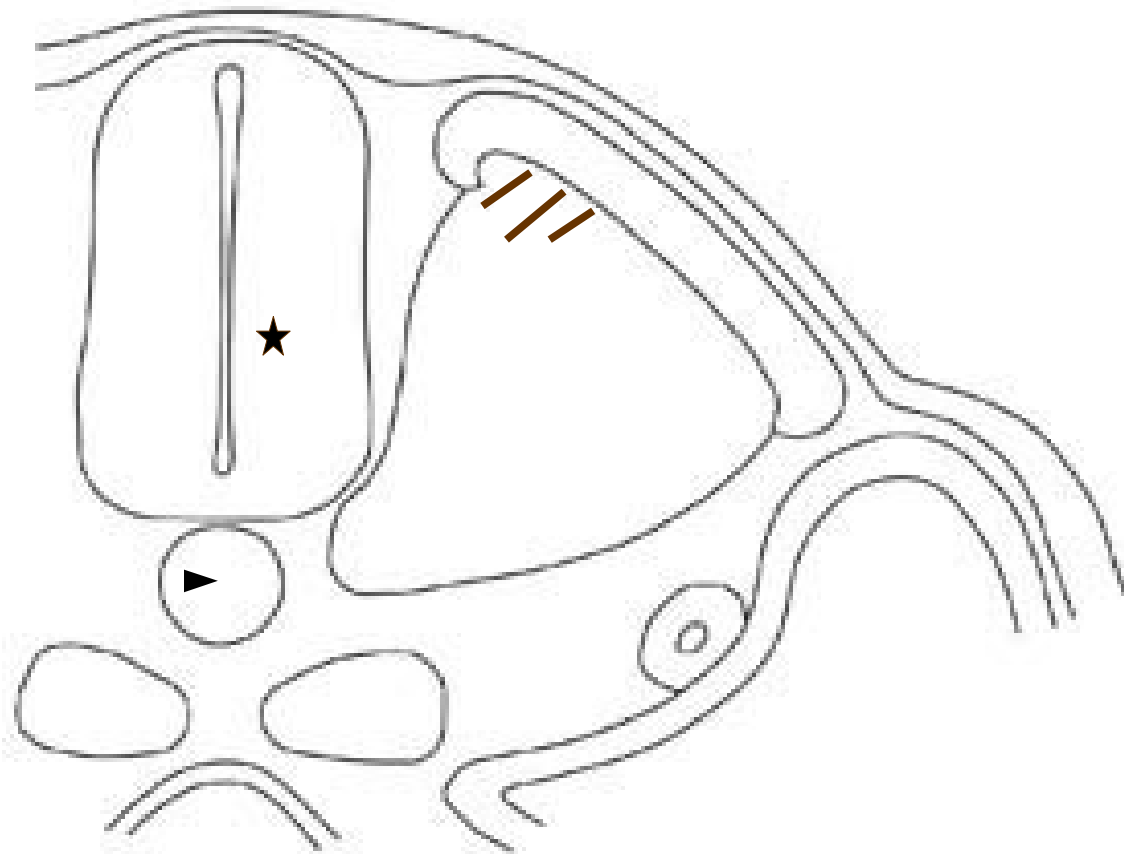


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Expressionsmuster von *MyoD* beim reifen Somiten; Pfeilspitze: Chorda dorsalis; Stern: Neuralrohr

Seitenplattenmesoderm und Wnt's aus dem dorsalen Neuralrohr (Scaal und Christ, 2004; Tapscott, 2005). Entscheidend für die Myotombildung ist die Expression von MDF's wie *MyoD*, die die Differenzierung der vormals epithelialen Zellen zu Myocyten erst ermöglichen. So war auch *MyoD* als beim Huhn wichtiger myotomaler Transkriptionsfaktor Gegenstand der Untersuchungen zur Ausbildung des Myotoms.

Wie von Pownall und Emerson (1992) beschrieben, beginnt die *MyoD*-Expression bereits dorsomedial im noch epithelialen Somite, lokalisiert sich dann, myotomale Zellen markierend, mit zunehmender Reifung in der dorsomedialen Lippe des Dermomyotoms (Scaal und Christ, 2004) und breitet sich schließlich unter diesem nach lateral aus.

Dieses Verhalten deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Auffälligkeiten und gravierende Unterschiede im Seitenvergleich bestehen bis auf leicht unterschiedliche Expressionsstärken, die vermutlich Artefakte sind, nicht.

4.5 Einfluss auf die Nierenentwicklung

Betrachtet man die Semidünnschnitte, so fällt eine nach kaudal fortschreitende größer erscheinende Ausbildung des nephrogenen Mesenchyms auf der operierten Seite auf. Zudem wirkt das Gewebe unstrukturierter als auf der linken, intakten Seite, wo es ventromedial-dorsolateral ausgerichtete Zellachsen aufweist. Bei fehlendem Wolffschen Gang erscheint das Mesenchym eher als ungerichtetes Zellkonglomerat, das, wie auf der intakten Seite, nach dorsolateral direkt Anschluss an die ventrale Wand der Vene findet.

In der immunhistochemischen Färbung lässt sich anhand der DAPI-Färbung auf die Zellkern- und damit auf die Zelldichte schließen, die aber auf beiden Seiten gleich zu sein scheint. Die Darstellung von *Pax2* auf Proteinebene mittels fluoreszierendem Antikörper lokalisiert die Expression im direkten Vergleich mit der DAPI-Färbung sinnvollerweise auf die Zellkerne. Hier erscheint die Expression im am weitesten kaudal angefertigten Schnitt am stärksten und erreicht die größte Ausdehnung, während sie sich nach kranial deutlich fokussiert. Auffällig ist, wie auch schon in den Semidünnschnitten zu bemerken, dass trotz Entfernung des Wolffschen Ganges eine Entwicklung des nephrogenen Mesenchyms stattfindet, und dass dort unabhängig von der Struktur des Wolffschen Ganges *Pax2* exprimiert wird. Die *Pax2*-Expression ist in Abb. 3 auf den Bereich des gesamten intermediären Mesoderms ausgedehnt, in weiter kranial angefertigten Schnittebenen ist sie auf der intakten Seite stark auf die Region medial des Wolffschen Ganges reduziert und auf der operierten Seite nur sehr schwach wahrzunehmen. Die Ausrichtung der Zellachsen stimmt mit den in den Semidünnschnitten gewonnen Erkenntnissen überein und ist auch hier auf der operierten Seite ungeordnet, während auf der intakten Seite eine deutliche Ausrichtung vom Wolffschen Gang ausgehend nach ventromedial festzustellen ist.

Auch die Vibratomschnitte aus *in situ*-hybridisierten Embryonen zeigen ähnliche Ergebnisse. Wenig kranial der Anlage der Hinterextremitäten erstreckt sich die *Pax2*-Expression über den Bereich des gesamten intermediären Mesoderms und wirkt auf der operierten Seite deutlich schwächer als auf der intakten. Interessanterweise scheint aber bei dieser Art des Nachweises, die sich auf mRNA stützt, die Expression von *Pax2* nach kranial stärker zu werden. Eine stärkere Fokussierung ist allerdings auch hier zu bemerken. Die stärkste Expression ist in allen Schnitten im Wolffschen Gang festzustellen.

Die in der letzten Abbildung auffallende Expression im Bereich der Somiten kann durch Überfärbung entstanden sein, jedoch ist für *Pax2* eine fluktuierende Expression am rostralen Ende des unsegmentierten paraxialen Mesoderm beschrieben (Mauch et al., 2000), die sich

möglicherweise auch noch in jungen Somiten darstellen könnte. Auch ist zu überlegen, ob die Differenz in der Stärke der Expression im nephrogenen Blastem, gerade auch im Vergleich der Vibratom- und Paraffinschnitte, nicht nur zufälliger Natur ist, sondern auch hier möglicherweise eine oszillierende *Pax2*-Expression möglich ist, die das verstärkte Auftreten von mRNA- und Proteinaktivität zu unterschiedlichen Zeiten erklären könnte. Hier muss jedoch, wie schon erwähnt, noch einmal ausdrücklich auf die eingeschränkte Aussagekraft solcher Schnitte im Hinblick auf die Sensitivität hingewiesen werden. Genauere Ergebnisse können in solchen Fällen nur über einen Western- oder Northern-Blot erlangt werden. In jedem Fall ist *Pax2* essentiell für den mesenchymal-epithelialen Übergang in der Nierenentwicklung (Rothenpieler et al., 1993).

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass die *Pax2*-Expression im intermediären Mesoderm nicht auf die Struktur des Wolffschen Ganges beschränkt ist und bei Entfernung desselben im nephrogenen Mesenchym weiterhin vorhanden ist. Von Interesse wäre in diesem Zusammenhang, ob durch eine vollständige Hemmung der *Pax2*-Expression auch im Mesenchym, beispielsweise über Knockout-Mäuse, Alterationen an reifenden Somiten beobachtet werden können. Bisher ist nur ein bei homozygoten *Pax2*^{-/-} Mäusen vollständiges Fehlen des aus dem intermediären Mesoderm generierten Genitale beschrieben (Torres et al., 1995).

5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung des Einflusses des Wolffschen Ganges auf die Somitenreifung. Dazu wurde bei Embryonen der Stadien HH8+ bis HH16 die proliferationsstarke mesenchymale Spitze des Wolffschen Ganges, die für das Auswachsen nach caudal verantwortlich ist, mikrochirurgisch entfernt. Nach einer kurzen Reinkubationszeit wurden dann die Embryonen in den Stadien HH15 bis HH19 untersucht.

Zur Verifikation der Operationsmethode und Darstellung der Entwicklung des intermediären Mesoderms wurden Semidünnschnitte, immunhistochemische Färbungen auf Paraffinschnitten sowie in situ-Hybridisierungen mit *Pax2*, einem Marker des intermediären Mesoderms, sowohl im Wholemount als auch in Schnittbildern, durchgeführt.

Somitische Markergene wie *Paraxis* und *Pax3* für das Dermomyotom, *Pax1* und *Pax9* für das Sklerotom und *MyoD* für das Myotom wurden genutzt, um den Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenentwicklung im Rumpfbereich zu untersuchen. In den Expressionsmustern dieser Gene konnte sowohl auf der, solitär betrachteten, operierten Seite als auch im Vergleich mit der nicht operierten Seite kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was den Schluss zulässt, dass es keinen direkten Einfluss des Wolffschen Ganges auf die Somitenentwicklung gibt.

Ein weiteres Ergebnis dieser Studie ist die auch bei fehlendem Wolffschen Gang persistierende *Pax2*-Expression in Zellen des nephrogenen Mesenchyms im intermediären Mesoderm. Allerdings verlieren diese mesenchymalen Zellen bei fehlendem Wolffschen Gang ihre ventromedial gerichtete Orientierung.

6 Summary

The present study explores the influence of the wolffian duct in somite maturation. The mesenchymal tip of the wolffian duct, on which depends its migration and proliferation in caudal direction, was removed microsurgically at stages of HH8+ to HH14. After a short period of reincubation, embryos were analyzed at stages HH15 to HH19.

For verification of the microsurgical technique and description of the development of the intermediate mesoderm, stained semithin sections were used, also in situ-hybridisation with *Pax2* on wholemount and on sections, and immunofluorescence with *Pax2*-antibody on paraffin sections. *Pax2* is, in the trunk, a specific marker of the intermediate mesoderm.

For examination of the Wolffian duct's influence on somite development at trunk level, somitic marker genes were used, like *Paraxis* and *Pax3* for the dermomyotome, *Pax1* and *Pax9* for the sclerotome and *MyoD* for the myotome. There was no influence detectable in the expression pattern of these genes on the operated side and in comparison with the non-operated side of the embryo, indicating that there is no direct influence of the Wolffian duct on somite development.

It turned out that there is still *Pax2*-expression in the intermediate mesoderm even in the absence of the Wolffian duct, located to the nephrogenic mesenchyme. At any rate these mesenchymal cells seem to lose direction when the Wolffian duct is missing, for cells are losing their ventromedial orientation.

7 Ausblick

Interessant wäre auf Grund der hier gewonnenen Ergebnisse zu untersuchen, ob das intermediäre Mesoderm insgesamt auf die Somitenentwicklung keinen direkten Einfluss hat, oder ob eventuelle Signale lediglich vom nephrogenen Mesenchym ausgehen bzw. ob dieses ein Fehlen des Wolffschen Ganges kompensieren kann.

Weitere Transkriptionsfaktoren, die an der Nierenentwicklung beteiligt sind und in Bezug auf die Somitenentwicklung untersucht werden könnten, sind z.B. der nahe mit *Pax2* verwandte Faktor *Pax8*, aber auch *Lim1* als wahrscheinlicher Cofaktor. Ein Synergismus in der Somitenentwicklung ist mit *Lunatic Fringe* und *EphA4* bekannt (Suetsugo et al., 2002). Für *Emx2* wird eine Interaktion in der Entwicklung des Genitale vermutet sowie eine Regulation der *Pax2*-Expression (Miyamoto et al., 1997 ; Hannema und Hughes, 2007). Auch ist *Gata3* als nachgeordnetes Gen zu nennen, das für das gerichtete Auswachsen und die Morphogenese des Wolffschen Ganges essentiell ist (Grote et al., 2005). Eine mögliche Einflussnahme all dieser Faktoren auf die Somitenentwicklung wäre somit sicherlich interessant zu untersuchen.

Auch die Untersuchung der Transkriptions- und Proteinaktivität der jeweiligen Gene im direkten Seitenvergleich bei einseitigem Fehlen des Wolffschen Ganges durch Northern- bzw. Western-Blot-Technik wäre von Interesse, um möglicherweise einen Schwellenwert in der Dosis-Wirkungs-Beziehung für Pax-Gene festzustellen. Genauso könnte die Untersuchung älterer operierter Embryonen möglicherweise noch neue Erkenntnisse bringen, z.B. mit Blick auf die Entwicklung des lateralen Dermomyotoms, das die Rippen bildet.

8 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Johanna Neumann

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
EM	Elektronenmikroskop
EMT	Epithelio-Mesenchymale Transition
et al.	et alii
etc.	et cetera
g	Gramm
h	Stunde (engl.: hour)
HH	Hamburger und Hamilton
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
ml	Milliliter
min.	Minute
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
OP	Operation
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
US	Untersuchung
z.B.	zum Beispiel
° C	Grad Celsius
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: EM- und schematische Darstellung eines jungen, epithelialen Somiten, modifiziert nach Christ et al. (2004)(EM) und Geetha-Loganathan et al. (2006)(Skizze); W: Wolffscher Gang; S: Somit; N: Neuralrohr; C: Chorda dorsalis; A: Aorta.....	5
Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische und schematische Darstellung eines reifen, kompartimentierten Somiten, modifiziert nach Christ et al. (2004)(EM) und Geetha-Laganathan et al. (2006)(Skizze); W: Wolffscher Gang; N: Neuralrohr; S: Sklerotom; D: Dermomyotom; C: Chorda dorsalis; A: Aorta.....	6
Abbildung 1.3: Grobe Übersicht der auf die Somitenentwicklung einflussnehmenden Faktoren.....	7
Abbildung 2.1: OP-Situs eines HH 9-Embryos; dicker Pfeil: nicht ablatierter Wolffscher Gang auf der linken Seite; dünner Pfeil: fehlende Struktur des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite; Sternchen: Beginn der Ablationsstelle. Auflichtmikroskop, Vergrößerung 15-fach.....	22
Abbildung 2.2: OP-Situs; Darstellung des intakten Wolffschen Ganges auf der rechten Seite eines HH 14 Embryos. Das Ektoderm wurde aufgeschnitten und zur Seite präpariert. Auflichtmikroskop, Vergrößerung 12-fach.....	23
Abbildung 3.1: Semidünnschnitt im kranialen Rumpf.....	35
Abbildung 3.2: Semidünnschnitt im Übergang zum mittleren Rumpf.....	35
Abbildung 3.3: Pax2.....	37
Abbildung 3.4: DAPI.....	37
Abbildung 3.5: Pax2.....	38
Abbildung 3.6: DAPI.....	38
Abbildung 3.7: Wholemoutdarstellung des Rumpfes eines HH 16+-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Pax2; Pfeil: Ablationsstelle.....	40
Abbildung 3.8: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene A; Pfeil: Wolffscher Gang.....	42
Abbildung 3.9: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene B; Pfeil: Wolffscher Gang.....	42
Abbildung 3.10: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene C; Pfeil: Wolffscher Gang.....	42
Abbildung 3.11: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene D; Pfeil: Wolffscher Gang.....	43

Abbildung 3.12: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene E; Pfeil: Wolffscher Gang.....	43
Abbildung 3.13: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene F; Pfeil: Wolffscher Gang.....	43
Abbildung 3.14: Wholemoundarstellung des Rumpfes eines HH 19-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-MyoD.....	46
Abbildung 3.15: Wholemoundarstellung des Rumpfes eines HH 18-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Paraxis.....	46
Abbildung 3.16: Wholemoundarstellung des Rumpfes eines HH 18-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Pax1.....	47
Abbildung 3.17: Wholemoundarstellung des Rumpfes eines HH 16+-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit q-Pax3.....	47
Abbildung 3.18: Wholemoundarstellung des Rumpfes eines HH 15+-Embryos mit Ablation des Wolffschen Ganges auf der rechten Seite nach in situ- Hybridisierung mit c-Pax9.....	47
Abbildung 3.19: Horizontaler Schnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 15+-Embryos; Schnittebene A; Pfeil: Wolffscher Gang.....	50
Abbildung 3.20: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 15+-Embryos; Schnittebene B; Pfeil: Wolffscher Gang.....	50
Abbildung 3.21: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 15+-Embryos; Schnittebene C; Pfeil: Wolffscher Gang.....	50
Abbildung 3.22: Horizontaler Schnitt durch einen HH 15-Embryo im mittleren Rumpf; Schnittebene D; Pfeil: Wolffscher Gang.....	51
Abbildung 3.23: Horizontaler Schnitt durch einen HH 15-Embryo im kranialen Rumpf; Schnittebene E; Pfeil: Wolffscher Gang.....	51
Abbildung 3.24: Horizontaler Schnitt durch einen HH 15-Embryo im kranialen Rumpf; Schnittebene F; Pfeil: Wolffscher Gang.....	51
Abbildung 3.25: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene A; Pfeil: Wolffscher Gang.....	54
Abbildung 3.26: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene B; Pfeil: Wolffscher Gang.....	54
Abbildung 3.27: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene C; Pfeil: Wolffscher Gang.....	54

Abbildung 3.28: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene D; Pfeil: Wolffscher Gang.....	55
Abbildung 3.29: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene E; Pfeil: Wolffscher Gang.....	55
Abbildung 3.30: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16+-Embryos; Schnittebene F; Pfeil: Wolffscher Gang.....	55
Abbildung 3.31: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16-Embryos; Schnittebene A; Pfeil: Wolffscher Gang.....	58
Abbildung 3.32: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 16-Embryos; Schnittebene B; Pfeil: Wolffscher Gang.....	58
Abbildung 3.33: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 16-Embryos; Schnittebene C; Pfeil: Wolffscher Gang.....	58
Abbildung 3.34: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16-Embryos; Schnittebene D; Pfeil: Wolffscher Gang.....	59
Abbildung 3.35: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16-Embryos; Schnittebene E; Pfeil: Wolffscher Gang.....	59
Abbildung 3.36: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 16-Embryos; Schnittebene F; Pfeil: Wolffscher Gang.....	59
Abbildung 3.37: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 17-Embryos; Schnittebene A; Pfeil: Wolffscher Gang.....	62
Abbildung 3.38: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 17-Embryos; Schnittebene B; Pfeil: Wolffscher Gang.....	62
Abbildung 3.39: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 17-Embryos; Schnittebene C; Pfeil: Wolffscher Gang.....	62
Abbildung 3.40: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 18-Embryos; Schnittebene D; Pfeil: Wolffscher Gang.....	63
Abbildung 3.41: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 18-Embryos; Schnittebene E; Pfeil: Wolffscher Gang.....	63
Abbildung 3.42: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 18-Embryos; Schnittebene F; Pfeil: Wolffscher Gang.....	63
Abbildung 3.43: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 15+-Embryos; Schnittebene A; Pfeil: Wolffscher Gang.....	66
Abbildung 3.44: Horizontalschnitt durch den kaudalen Rumpf eines HH 15+-Embryos; Schittebene B; Pfeil: Wolffscher Gang.....	66

Abbildung 3.45: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 17- Embryos; Schnittebene C; Pfeil: Wolffscher Gang.....	66
Abbildung 3.46: Horizontalschnitt durch den mittleren Rumpf eines HH 17-Embryos; Schnittebene D; Pfeil: Wolffscher Gang.....	67
Abbildung 3.47: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 18-Embryos; Schnittebene E; Pfeil: Wolffscher Gang.....	67
Abbildung 3.48: Horizontalschnitt durch den kranialen Rumpf eines HH 18-Embryos; Schnittebene F; Pfeil: Wolffscher Gang.....	67
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Expressionsmuster von Pax 9 (rot) und Pax1 (grün) beim reifen Somiten; Pfeilspitze: Chorda dorsalis; Stern: Neuralrohr.....	70
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Expressionsmuster von Paraxis (gelb) und Pax3 (blau) beim reifen Somiten; Pfeilspitze: Chorda dorsalis; Stern: Neuralrohr.....	72
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Expressionsmuster von MyoD beim reifen Somiten; Pfeilspitze: Chorda dorsalis; Stern: Neuralrohr.....	74

10 Literaturverzeichnis

- Aoyama, H (1993). „Developmental plasticity of the prospective dermatome and the prospective sclerotome region of an avian somite“ Dev. Growth. Differ. **35**:507-519
- Araujo, M. und M.A. Nieto (1997). „The expression of chick EphA4 during segmentation in the central and peripheral nervous system“ Mech. Dev. **68**:173-177
- Arendt, D und K. Nübler-Jung (1999). „Rearranging gastrulation in the name of yolk: Evolution of gastrulation in yolk-rich amniote eggs“ Mech. Dev. **81**: 3-22
- Aulehla, A. und R.L. Johanson (1999). „Dynamic expression of lunatic fringe suggests a link between notch signalling and an autonomous cellular oscillator driving somite segmentation“ Dev. Biol. **207**:49-61
- Balfour, F.M. (1881) „Handbuch der vergleichenden Embryologie“ 2.Band, Fischer, Jena
- Balling, R., A. Neubüser und B. Christ (1996). „Pax genes and sclerotome development“ Semin. Cell. Dev. Biol. **7**:129-136
- Balling, R., U. Helwig, J. Nadeau, A. Neubüser, W. Schmahl und K. Imai (1996). „Pax Genes and Skeletal Development“ Ann. N. Y. Acad. Sci. 27-33
- Barnes, G.L., C.W. Hsu, B. D. Mariani und R.S. Tuan (1996). „Chicken Pax-1 gene: structure and expression during embryonic somite development“ Diff. **61**:13-23
- Bothe, I., M. U. Ahmed, F.L. Winterbottom, G. v. Scheven und S. Dittrich (2007). „Extrinsic Versus Intrinsic Cues in Avian Paraxial Mesoderm Patterning and Differentiation“ Dev. Dyn. **236**:2397-2409
- Brand-Saberi, B., J. Wilting, C. Ebensperger und B. Christ (1996). „The formation of somite compartments in the avian embryo“ Int. J. Dev. Biol. **40**: 411-420
- Brand-Saberi, B. und B. Christ (2000). „Evolution and development of distinct cell lineages derived from somites“ In: Ordahl, C.P. (ed), Somitogenesis. Curr. Top. Dev. Biol., vol.47. Academic Press, New York, pp 255-296
- Brent, A.E., und C.J. Tabin (2002). „Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon“ Curr. Opin. Genet. Dev. **12**:548-557
- Brent, A.E., R. Schweitzer und C.J. Tabin (2003). „A somitic compartment of tendon progenitors“ Cell **113**:235-248

- Burgess, R., A. Rawls, D. Brown, A. Bradley und E.N. Olson (1996). „Requirement of the paraxis gene for somite formation and musculoskeletal patterning“ Nat. **384**:570-573
- Burke, A.C., (2000). „Hox genes and the global patterning of the somitic mesoderm“ Curr. Top. Dev. Biol. **47**:155-181
- Buttitta, L., R. Mo, C.C. Hui und C.M. Fan (2003). „Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependant sclerotome induction“ Dev. **130**:6233-6243
- Christ, B., H.J. Jacob und M. Jacob (1977). „Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos“ Anat. Embryol. **150**:171-186
- Christ, B., H.J. Jacob und M. Jacob (1978). „On the formation of the myotomes in avian embryos. An experimental and scanning electron microscopy study.“ Experi. **34**:514-516
- Christ, B., H.J. Jacob und M. Jacob (1979). „Über Gestaltungsfunktionen der Somiten bei der Entwicklung der Körperwand von Hühnerembryonen“ Verh. Anat. Ges. **73**:509-518
- Christ, B., B. Brand-Saberi, M. Grim und J. Wilting (1992). „Local signalling in dermomyotomal cell type specification“ Anat. Embryol. **186**:505-510
- Christ, B und J. Wilting (1992). „From somites to vertebral column“ Anat. Anz. **174**:23-32
- Christ, B., und C.P. Ordahl (1995). „Early stages of chick somite development“ Anat. Embryol. **191**:381-396
- Christ, B., C. Schmidt, R. Huang, J. Wilting und B. Brand-Saberi (1998). „Segmentation of the vertebrate body“ Anat. Embryol. **197**:1-8
- Christ, B., R. Huang und M. Scaal (2004). „Formation and differentiation of the avian sclerotome“ Anat. Embryol. **208**:333-350
- Christ, B., R. Huang, und M. Scaal (2007). „Amniote Somite Derivatives“ Dev. Dyn. **236**:2382-2396
- Cossu, G. und U. Borello (1999). „Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals“ EMBO. J. **18**:6867-6872
- Darnell, D.K., M.R. Stark (1999). „Timing and cell interactions underlying neural induction in the chick embryo“ Dev. **126**:2505-2514
- Davis, R.L., H. Weintraub und A.B. Lassar (1987). „Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts“ Cell **51**:987-1000

- Denetclaw, W.F. und C.P. Ordahl (2000). „The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos“ Dev. **127**, 893-905
- Denetclaw, W.F. jr., E. Berdough, S.J. Venters und C.P. Ordahl (2001). „ Morphogenetic cell movements in the middle region of the dermomyotome dorsomedial lip associated with patterning and growth of the primary epaxial myotome“ Dev. **128**:1745-1755
- Deutsch, U., G.R. Dressler und P. Gruss (1988). „Pax1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development“ Cell **53**:617
- Dhoot, G.K., M.K. Gustafsson, X. Ai, W. Sun, D.M. Standiford und C.P. Emerson jr. (2001). „Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase“ Sci. **293**:1663-1666
- Duband, J-L, S. Dufour, K. Hatta, M. Takeichi, G.M. Edelman und J.P. Thiery (1987). „Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo“ J. Cell. Biol. **104**:1361
- Dubrulle, J. und O. Pourquie (2004). „Coupling segmentation to axis formation“ Dev. **131**:5783-5793
- Ebensperger, C., J. Wilting; B. Brand-Saberi, Y. Mizutani, B. Christ, R. Balling und H. Koseki (1995). „Pax-1, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos“ Anat. Embryol. **191**:297-310
- Eloy-Trinquet, S., L. Mathis und J.F. Nicolas (2000). „Retrospective tracing of the developmental lineage of the mouse myotome“ Curr. Top. Dev. Biol. **47**:33-80
- Eyal-Giladi, H (1997). „Establishment of the axis in chordates: facts and speculations“ Dev. **124**:2285-2296
- Fan, C-M. und M. Tessier-Lavigne (1994). „Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog“ Cell **79**:1175-1186
- Galli, L.M., S.R. Knight, T.L. Barnes, A.K. Doak, R.S. Kadzik und L. W. Burrus (2008). „Identification and Characterization of Subpopulations of Pax3 and Pax7 Expression Cells in Developing Chick Somites and Limb Buds“ Dev. Dyn. **237**: 1862-1874
- Geetha-Loganathan, P., S. Nimmagadda, R. Huang, B. Christ und M. Scaal (2006). „Regulation of ectodermal Wnt6 expression by the neural tube is transduced by

dermomyotomal Wnt11: a mechanism of dermomyotomal lip sustainment“ Dev. **133**:2897-2904

Gilbert, S.F. (2000). „Developmental Biology“ 6th Edition, Swartmore College, Sunderland(MA): Sinauer Associates

Goodrich, E.S. (1958). „Studies on the structure and development of vertebrates“ New York: Dover Publications Inc.

Gros, J., M. Scaal und C. Marcelle (2004): „A two step mechanism for myotome formation in chick“ Dev. Cell **6**:875-882

Gros, J, M. Manceau, V. Thome und C. Marcelle (2005). „A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells“ Nat. **435**:954-958

Grote, D., A. Souabni, M. Busslinger und M. Bouchard (2005). „Pax2/8-regulated Gata3 expression is necessary for morphogenesis and guidance of the nephric duct in the developing kidney“ Dev. **133**, 53-61 doi: 10.1242/dev.02184

Halata, Z., M. Grim und B. Christ (1990). „Origin of spinal chord meninges sheaths of peripheral nerves and cutaneous receptors including Merkel cells. An experimental and ultrastructural study with avian chimeras“ Anat. Embryol. **182**:529-537

Hamburger, V. und H.L. Hamilton (1951). „A series of normal stages in the development of the chick embryo“ J. Morphol. :49-92

Hannema, S.E. und I.A. Hughes (2007). „Regulation of Wolffian Duct Development“ Horm. Res. 2007;**67**:142-151 published online

Hatschek (1880), zitiert nach Williams, L.W. (1910). „The somites of the chick“ Am. J. Anat. **11**: 55-100

Hatta, K., S. Takagi, H. Fujisawa und M. Takeichi (1987). „Spatial and temporal expression pattern of n-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos“ Dev Biol **120**:215-227

Heim, Kathrin (2011). „Vergleichende Untersuchung über die Entwicklung und Kompartimentierung der sakralen und kokzygealen Somiten im Hühnerembryo“ Inaugural-Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 21.02.2011

Hiruma, T. und H. Nakamura (2003). „Origin and development of the pronephros in the chick embryo“ J. Anat. **203**, pp539-552

Holtfreter, J und V. Hamburger (1955). „Amphibians“ in Anal. Dev. 230-296

Hrabe de Angelis, M., J. McIntyre und A. Gossler (1997). „Maintenance of somite borders in mice requires the delta homologue Dll1“ Nat. **386**:717-721

Huang, R., Q. Zhi, C.P. Ordahl und B. Christ (2000). „Sclerotomal origin of the ribs“ Dev. **127**:527-532

Ikeya, M. und S. Takada (1998). „Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome“ Dev. **125**, 4969-4976

Jacob, H.J. und B. Christ (1974). „Die Somitogenese beim Hühnerembryo. Experimente zur Lageentwicklung des Myotom“ Verh. Anat. Ges. **68**:581-589

Jacob, M., Christ, B. und H.J. Jacob (1975). „Über die regionale Determination des paraxialen Mesoderms junger Hühnerembryonen“ Verh. Anat. Ges. **69**:263-269

Jacob H.J. und B. Christ (1978). „Experimentelle Untersuchungen am Exkretionsapparat junger Hühnerembryonen“ 19th Morphological Congress Symposia Charles University Prague

Jacob, H.J., M. Jacob und B. Christ (1978). „Die Feinstruktur des Wolffschen Ganges bei Hühnerembryonen“ Verh. Anat. Ges. **72**, S. 363-364

Jacob, H.J., B. Christ und M. Grim (1982). „Problems of muscle pattern formation and of neuromuscular relations in avian limb development“ In: Kelley RO, Goetinck PF, MacCabe JA, editors. Proceedings of the third International Conference on Limb Morphogenesis and Regeneration, Storrs, CT. New York: Alan R. Liss, Inc., Part B p 333-341

Jacob, M., B. Christ, H.J. Jacob und R. Poelmann (1991). „The role of fibronectin and laminin in development and migration of the avian Wolffian duct with reference to somitogenesis“ Anat. Embryol. **183**: 385-395

Johnson, R.L., E. Läufer, R.D. Riddle und C. Tabin (1994). „Ectopic expression of sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites“ Cell **79**:1165-1173

Joseph, A., H. Yao und B.T. Hinton (2009). „Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns“ Dev. Biol. **325** 6-14

- Kablar, B, A. Akasura, K. Krastel, C. Ying, L.L. May, D.J. Goldhamer und M.A. Rudnicki (1998). „MyoD and Myf5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin“ Biochem. Cell. Biol. **76**: 1079-1091
- Kaehn, V., H.J. Jacob, B. Christ, K. Hinrichsen und R.E. Poelmann (1988). „The onset of myotome formation in the chick“ Anat Embryol **177**:191-201
- Kessel, M. und P. Gruss (1991). „Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid“ Cell **67**:89-104
- Klessinger, S. und B. Christ (1996) „Axial structures control laterality in the distribution pattern of endothelial cells“ Anat. Embryol. **193**:319-330
- Kopan, R., J.S. Nye und H. Weintraub (1994). „The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD“ Dev. **120**:2385-2396
- Lee, C.S., L. Buttitta und C. M. Fan (2001). „Evidence that the WNT inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signalin in the somite“ Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**:11347-11352
- Linker, C., C. Lesbros, J. Grus, L.W. Burrus, A. Rawls und C. Marcelle (2005). „ β -Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis“ Dev. **132**, 3895-3905
- Locke, F.S. und O. Rosenheim (1907). „Contributions to the physiology of the isolates heart. The consumption of dextrose by mammalian cardiac muscle“ J. Physiol. **36(4-5)**:205-220
- Mauch, T.J, G. Yang, M. Wright, D. Smith und G.C. Schoenwolf (2000). „Signals from trunk paraxial mesoderm induce pronephros formation in chick intermediate mesoderm“ Dev. Biol. **220**, 62-75
- Mauger, A. (1972). „The role of somitic mesoderm in teh development of dorsal plumage in chick embryos. I. Origin, regulative capacity and determination of the plumage-forming mesoderm“ J. Embryol. Exp. Morphol. **28**:313-341
- McGrew, M.J., J.K. Dale, S. Fraboulet und O. Pourquie (1998). „The lunatic fringe gene is a target of the molecular clock linked to somite segmentation in avian embryos“ Curr. Biol. **8**:979-982

- McMahon, J.A., S.Takada, L.B. Zimmerman, C.M. Fan, R.M. Harland und A.P. McMahon (1998). „Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite“ Genes. Dev. **12**:1438-1452
- Miyamoto, N., M. Yoshida, S. Kuratani, I. Matsuo und S. Aizawa (1997). „Defects of urogenital development in mice lacking Emx2“ Dev. **124**, 1653-1664
- Monsoro-Burq; A.H., D. Duprez, Y. Watanabe, M. Bontoux, C. Vincent, P. Brickell und N. Le Douarin (1996). „The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development“ Dev. **122**, 3607-3616
- Monsoro-Burq, A.H. und N.M. Le Douarin (2000). „Duality of molecular signaling involved in vertebral chondrogenesis“ In: C.P. Ordahl (ed), Somitogenesis, part 2., Academic Press, London, pp 43-75
- Müller, T.S., C. Ebensperger, A. Neubüser, H. Koseki, R. Balling, B. Christ und J. Wilting (1996). „Expression of avian Pax-1 and Pax-9 in the sclerotomes is controlled by axial and lateral tissues, but intrinsically regulated in pharyngeal endoderm“ Dev. Biol. **178**:403-417
- New, D.A.T. (1956). „The formation of sub-blastodermic fluid in hens' eggs“ J. Embryol. Exp. Morphol. **7**:146-164
- Obara-Ishihara, T., J. Kuhlman, L. Niswander und D. Herzlinger (1999). „The surface ectoderm is essential for nephric duct formation in intermediate mesoderm“ Dev. **126**, 1103-1108
- Palmeirim, I., D. Henrique, D. Ish-Horowicz und O. Pourquie (1997). „Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis“ Cell **91**:639-648
- Peters, H., B. Wilm, N. Sakai, K. Imai, R. Maas und R. Balling (1999). „Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development“ Dev. **126**, 5399-5408
- Pourquie, O., C.M. Fan, M. Coltey, E. Hirsinger, Y. Watanabe, C. Breant, P. Francis-West, P. Brickell, M. Tessier-Lavigne und N.M. Le Douarin (1996). „Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4“ Cell **84**(3):461-471
- Pownall, M.E. und C. P. Emerson (1992). „Sequential activation of myogenic regulatory genes during somite morphogenesis in quail embryos“ Dev. Biol. **151**:67-79

- Psychoyos, D. und C.D. Stern (1996). „Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo“ Dev **122**:1523-1534
- Rickmann, M., L.W. Fawcett und R.J. Keynes (1985). „The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite“ J Embryol Exp Morph **90**:437
- Romanoff (1960) „The avian embryo“ McMillan, New York
- Rothenpieler, U.W. und G.R. Dressler (1993). „Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development“ Dev **119**, 711-720
- Sartorelli, V., J. Huang, Y. Hamamori und L. Kedes (1997). „Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C“ Mol. Cell Biol **17**:1010-1026
- Scaal, M. und B. Christ (2004). „Formation and differentiation of the avian dermomyotome“ Anat. Embryol **208**:411-424
- Schoenwolf, G.C., V. Garcia-Martinez und M.S. Diaz (1992). „Mesoderm movement and fate during amphibian gastrulation and neurulation“ Dev. Dyn **193**:235-248
- Schoenwolf, G.C. (2001). „Laboratory studies of vertebrate and invertebrate embryos“ Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 360 p.
- Serra, J.A. (1946). „Histological tests for proteins and amino acids; the characterization of basic proteins“ Stain. Technol **21**:5-18
- Solursh, M., M. Fischer, S. Meier und C.T. Singley (1979) „The role of extracellular matrix in the formation of the sclerotome“ J. Embryol. Exp. Morph **54**:75-98
- Sosic, D., B. Brand-Saberi, C. Schmidt, B. Christ und E.N. Olsen (1997). „Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals“ Dev. Biol **185**:229-243
- Spence, M.S., J. Yip und C.A. Erickson (1996). „The dorsal neural tube organizes the dermomyotome and induces axial myocytes in the avial embryo“ Dev **122**, 231-241
- Stockdale, F.E., W. Nikovits jr. und B. Christ (2000). „Molecular and Cellular Biology of Avian Somite Development“ Dev. Dyn **219**:304-321

- Suetsugu, R., Y. Sato und Y. Takahashi (2002). „Pax2 expression in mesodermal segmentation and its relationship with EphA4 and Lunatic-fringe during chicken somitogenesis“ Mech. Dev. **119S** S155-S159
- Takada, S., K.L.Stark, M.J. Shea, G. Vassileva, J.A. McMahon und A.P. McMahon (1994). „Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo“ Genes Dev **8**:174-189
- Takeichi, M. (1988). „The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis“ Dev. **102**:630-655
- Tapscott, S.J. und H. Weintraub (1991). „MyoD and the Regulation of Myogenesis by Helix-Loop-Helix Proteins“ J. Clin. Invest., 0021-9738/91/04/1133/06, **Volume 87**, April 1991, 1133-1138
- Tapscott, S. (2005). „The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription“ Dev. **132**:2685-2695
- Taylor, S.M. und P.A. Jones (1979). „Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 cells treated with 5-azacytidine“ Cell **17**:771-779
- Teillet, M-A., C. Kalcheim und N.M. Le Douarin (1987) „Formation of the dorsal root ganglion in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells“ Dev. Biol. **120**:329
- Töndury, G. (1958). „Entwicklungsgeschichte und Fehlbildungen der Wirbelsäule“ Hippokrates, Stuttgart
- Torres, M., E. Gomez-Pardo, G.R. Dressler und P. Gruss (1995). „Pax-2 controls multiple steps of urogenital development“ Dev. **121**, 4057-4065
- Trelstad, R.L. (1977). „Mesenchymal cell polarity and morphogenesis of chick cartilage“ Dev. Biol. **59**:153-163
- Wallin, J., J. Wilting, H. Koseki, R. Fritsch, B. Christ und R. Balling (1994). „The role of Pax-1 in axial skeleton development“ Dev. **120**, 1109-1121
- Watanabe, Y. und N.M. Le Douarin (1996). „A role for BMP-4 in the development of subcutaneous cartilage“ Mech. Dev. **57**:69-78
- Williams, B.A. und C.P. Ordahl (1994). „Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification“ Dev. **120**: 785-796

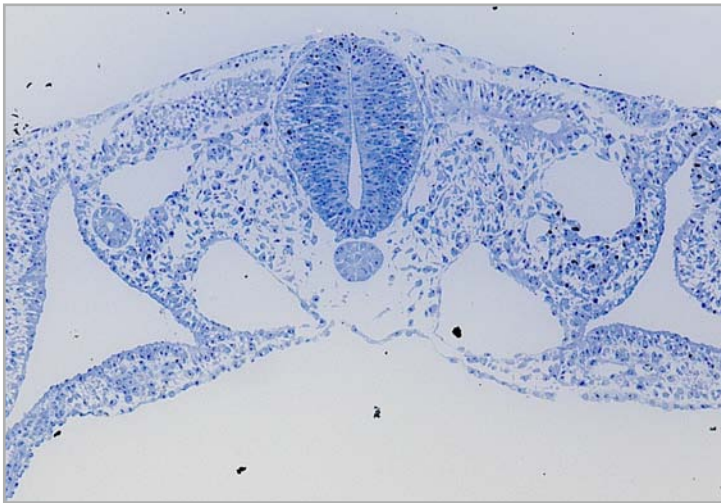
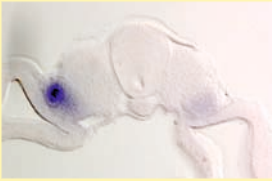
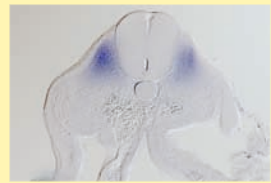
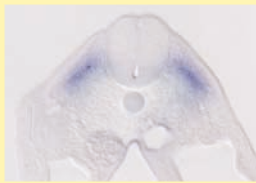
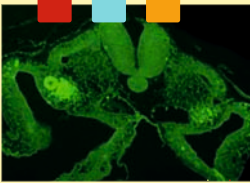
Wilson-Rawls, J., C.R. Hurt, S.M. Parsons und A. Rawls (1999). „Differential regulation of epaxial and hypaxial muscle development by Paraxis“ Dev. **126**, 5217-5229

Woolf, A.S. und S.J.M. Welham (2002). „Cell turnover in normal and abnormal kidney development“ Nephrol. Dial. Transp. **17** (Suppl 9): 2-4

11 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere gilt mein Dank

- meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Bergmann für die Bereitschaft zur Betreuung dieser externen Dissertation
- meinem Betreuer Prof. Dr. M. Scaal, der mir die Durchführung dieser Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und mich hervorragend betreut und unterstützt hat
- Martina Suhm für die hervorragende Einarbeitung, Geduld und ihre Freundschaft. Ihre Bereitschaft zu Diskussion und Erklärung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
- Ute Baur für die engagierte Einarbeitung und Unterstützung
- Günter Frank, Dr. Attila Magyar, Lidia Koschny, Ute Lausch, Helmut Gerlach und Stefanie Krück für die Hilfsbereitschaft bei technischen und nicht-technischen Problemen
- allen Doktoranden des Lehrstuhl 2 für die entspannte und fruchtbare Zusammenarbeit
- Ramona Hafner für die „interdisziplinären Diskussionen“
- meinen Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben
- meinen Freunden, besonders Gudrun Beckmann, die mich immer wieder aufgebaut hat und mich an jedem Ort der Welt besuchen kommt
- meinen „WG-Mitbewohnern“ in Freiburg für ein unkompliziertes Miteinander
- und nicht zuletzt meinem Mann, der mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat und mir in allem und immer tapfer zur Seite steht



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5878-4



9 78 3 8359 5878 4